

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'IMPACT DE LA MT1-MMP SUR LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES
« COLONY STIMULATING FACTORS » DANS LES CELLULES SOUCHES
MESENCHYMATEUSES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
ALAIN ZGHEIB

AOÛT 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout premièrement remercier mon directeur de recherche, le Dr Borhane Annabi, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir intégré dans son équipe de recherche. Je le remercie pour ses encouragements, ses connaissances, sa motivation et son support constant qui m'ont permis de bien réussir tout au long de ma maîtrise.

Je remercie aussi la Dre Sylvie Lamy et madame Julie Poirier pour leur présence et leur disponibilité à répondre à toutes mes questions. Merci particulièrement à Amélie Vézina pour avoir été celle qui m'a appris les techniques et la dynamique du laboratoire et merci aussi à tous mes autres collègues de laboratoire : Michel Desjarlais, Jonathan Pratt, Rima Chokor, Paula Liana Moldovan, Arwa Ben Saad Lounis et Amira Ouanouki pour tous leurs conseils.

Je veux remercier mes parents et mon frère pour tout le soutien nécessaire dont j'ai eu besoin afin de persévérer et réussir dans ma vie. Merci à ma famille qui m'a accueilli au Canada et ma copine pour m'avoir facilité l'intégration au Canada.

Enfin, je tiens à souligner la contribution de la Fondation UQAM pour son soutien financier en m'attribuant une bourse du Fonds à l'Accessibilité et à la Réussite des Études (FARE).

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 La cancérogenèse.....	2
1.1.3 La métastase et l'invasion	4
1.1.4 Angiogenèse physiologique et angiogenèse pathologique	7
1.2 Les cellules souches	9
1.2.1 Définition.....	9
1.2.2 Classification des cellules souches	10
1.2.3 La contribution des cellules souches au développement tumoral	12
1.2.4 Les cellules souches mésenchymateuses	12
1.2.5 MSC et angiogenèse	14
1.3 Les cytokines	16
1.3.1 Définition.....	16
1.3.2 Rôle des cytokines dans le développement tumoral.....	18
1.3.3 Les facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale.....	18
1.3.4 Les "colony stimulating factors"	21
1.4 Les processus cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse tumorale	22

1.4.1	Les récepteurs "Toll Like Receptors"	22
1.4.2	Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire	25
1.4.3	Classification des métalloprotéases	25
1.4.4	Les fonctions de la MT1-MMP	28
1.4.5	La contribution de la MT1-MMP à la signalisation cellulaire	30
1.4.6	La contribution de la MT1-MMP au développement tumoral	30
1.4.7	La voie de signalisation JAK/STAT	32
CHAPITRE II		
	PROJET DE RECHERCHE	35
2.1	Problématique	35
2.2	Hypothèses de travail	36
2.3	Objectifs de recherche	36
CHAPITRE III		
EPIGALLOCATECHIN-GALLATE TARGETING OF MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE-MEDIATED SRC AND JAK/STAT3 SIGNALLING INHIBITS TRANSCRIPTION OF COLONY STIMULATING FACTOR-2 AND -3 IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS		38
3.1	Abstract	40
3.2	Introduction	41
3.3	Materials and methods	43
3.4	Results	46
3.5	Discussion	49
3.6	Acknowledgements	53
3.7	Figures	54
CHAPITRE IV		
SELECTIVE JAK/STAT3 SIGNALLING REGULATES COLONY STIMULATING FACTORS-2 AND -3 TRANSCRIPTION IN CONCANAVALIN-A ACTIVATED MESENCHYMAL STROMAL CELLS		65

4.1 Abstract	67
4.2 Introduction	68
4.3 Materials and methods	70
4.4 Results	73
4.5 Discussion	76
4.6 Acknowledgements	80
4.7 Figures	81
CHAPITRE V	
DISCUSSION	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	93
RÉFÉRENCES.....	95

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Les étapes de la cancérogenèse	2
1.2 Caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses	4
1.3 Le processus métastatique.....	6
1.4 Le processus d'angiogenèse tumorale.....	8
1.5 Source des cellules souches	11
1.6 Propriétés biologiques des MSC	13
1.7 Contribution des MSC à la progression tumorale	15
1.8 Le « switch angiogénique »	19
1.9 Les TLR et leurs ligands	24
1.10 Classification des MMPs selon leurs domaines	27
1.11 Structure de la MT1-MMP	29
1.12 Induction de différents processus tumoraux par la MT1-MMP	31
1.13 Activation de Stat3	34
3.1 Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression.....	54
3.2 TLR-2 and TLR-6 gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation	55
3.3 EGCG inhibits Concanavalin-A-induced CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression.....	56

3.4 EGCG inhibits Concanavalin-A-induced short-term Src phosphorylation and long-term STAT3 phosphorylation.....	57
3.5 MT1-MMP and Src gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced Src and STAT3 phosphorylation.....	58
3.6 MT1-MMP and Src gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation	59
3.7 MT1-MMP overexpression triggers CSF-2 and CSF-3 gene expression and requires phosphorylation of Tyr ⁵⁷³ in its intracellular domain.....	61
3.8 EGCG inhibits MT1-MMP-induced Src and STAT3 phosphorylation, and inhibits CSF-2 and CSF-3 gene expression.....	63
3.9 Scheme summarizing the effects of EGCG against the molecular mechanisms involved in Concanavalin-A- and MT1-MMP-mediated regulation of CSF-2 and CSF-3 transcription	64
4.1 Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression.....	81
4.2 MT1-MMP or STAT3 gene silencing abrogates ConA-induced CSF-2, and CSF-3 transcriptional regulation.....	82
4.3 Pharmacological inhibition of JAK family members selectively antagonizes ConA-mediated increases of MT1-MMP, CSF-1, -2, and -3.....	83
4.4 Evidence for selective JAK involvement in ConA-induced CSF-2 and CSF-3 gene expression.....	85
4.5 Schematic representation of the signalling partners involved in the transcriptional regulation of angiogenic CSF-2 and -3	86
5.1 Schéma récapitulatif de l'effet de l'EGCG sur la voie de signalisation responsable de la régulation de CSF-2 et de CSF-3 médiée par la ConA et la MT1-MMP	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau

Page

1.1 Fonctions des quatre familles de cytokine	17
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

3BP2	<i>Abl-SH3-domain binding protein 2</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG3340	Prinomastat
AG490	Tyrphostine AG 490
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
Akt	Protéine kinase B
Alk5	Récepteur sérine/threonine-protéine kinase
Ang	Angiopoïétine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
bFGF/TGFβ	Facteur de croissance basal des fibroblastes
BSA	Albumine sérique bovine
CD13	<i>alanine aminopeptidase</i>
CD24	<i>Heat stable antigen</i>
CD31	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
CD44	<i>Hematopoietic Cell E-selectin/L-selectin Ligand</i>
CD45	<i>Leukocyte common antigen</i>
CD133	<i>Prominin-1</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaline A
COX-2	Cyclooxygénase 2
CP690550	Tofacitinib
CpGRNA	<i>Novel single-stranded RNA</i>
CSF-1	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
CSF-2	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
CSF-3	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>

dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
EC	Cellules endothéliales
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
EPC	Cellules progénitrices endothéliales
EPO	Érythropoïétine
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fas	Fragment stimulateur de l'apoptose
FERM	<i>Four point one protein Ezrin, Radixin, Moesin</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR	Récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes
FLK1/KDR	<i>Fetal Liver Kinase 1</i>
FLT4	<i>Fms-related tyrosine kinase 4</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HPC	Cellules progénitrices hématopoïétiques
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IL	Interleukine
INF	Interferon
JAK	Janus Kinase
JH	<i>JAK homology</i>
LPA	Acide lisophosphatidique
LPS	Lipopolysaccharide
MAPC	<i>Multipotent adult progenitor cells</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	Cellules humaines du cancer des seins / <i>Michigan Cancer Foundation</i>
MD-2/LY96	<i>Lymphocyte antigen 96</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase</i>

MIP	<i>Macrophage inflammatory proteins</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
MTCBP-1	<i>Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail bind protein 1</i>
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Cellule tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
P130cas	<i>Crk-associated substrate</i>
P38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de la polymérase en chaîne
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PP2	Inhibiteur tyrosine kinase de la famille Src
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
qPCR/RT-PCR	<i>Real-time reverse-transcription PCR</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
Ras	<i>Rat sarcoma proteins</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family A</i>
ROK	<i>Repressor of the transcriptional activator ComK</i>
S1P	Sphingosine 1 phosphate
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Gel électrophorétique de polyacrylamide – SDS
SiRNA	<i>Single interfering RNA</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
Src	<i>Rous sarcoma tyrosine kinase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

TAD	Domaine de transactivation
TGF	Facteur de croissance transformant
TICAM2	<i>TIR domain-containing adapter molecule 2</i>
Tie-2	<i>Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 2</i>
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases matricielles
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	Facteur nécrosant tumoral
TRAM	<i>Translocating chain-associating membrane protein</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing $INF\beta$</i>
TYK2	Tyrosine Kinase 2
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
Wt	<i>Wild Type</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>

RÉSUMÉ

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse sont recrutées au site tumoral pour contribuer, par effet paracrine, à la néovascularisation des tumeurs via leurs propriétés immunomodulatrices en sécrétant des cytokines et des chemokines. Parmi ces cytokines, les « Colony Stimulating Factors » (CSF) sont reconnues être impliquées dans les processus menant à la progression tumorale telle l'invasion, la migration, la métastase et l'angiogenèse. Les CSF sont responsables de l'activation des cellules endothéliales pour induire la formation de nouveaux capillaires permettant la vascularisation des tumeurs. La MT1-MMP, une métalloprotéase surexprimée au niveau des foyers tumoraux, joue un rôle important dans la régulation de plusieurs voies de signalisations intracellulaires impliquées dans le développement tumoral. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulés par le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP et induisant la progression tumorale permettrait d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans notre étude, nous avons utilisé la Concanavaline-A (ConA) comme agoniste des récepteurs « Toll-Like Receptors » (TLR), spécifiquement les TLR-2 et TLR-6 exprimés au niveau des MSC, et comme inducteur de la métalloprotéase matricielle de type membranaire-1 (MT1-MMP). Nous avons démontré que la ConA est responsable de l'induction génique du granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF, CSF-2), du granulocyte CSF (G-CSF, CSF-3), et de l'expression de la MT1-MMP. De plus, nous avons découvert deux axes de signalisation Src et JAK/Stat3 médiés par MT1-MMP et responsables de la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 dans les MSC. De plus, la surexpression d'une forme recombinante mutée au niveau du domaine cytoplasmique de MT1-MMP (Y573F) non-phosphorylable prévient l'induction génique des CSF-2 et CSF-3. Par la suite, nous avons démontré que l'AG490, un inhibiteur pharmacologique de JAK-2, inhibe l'induction de CSF-2 et de la MT1-MMP par la ConA et que le Tofacitinib, un inhibiteur de JAK dose-dépendant, inhibe l'induction de MT1-MMP, de CSF-2 et de CSF-3. En utilisant la méthode des ARN interférant (siRNA), nous avons également trouvé que JAK-1, JAK-3 et TYK-2 tous prévenaient l'induction de CSF-3 alors que JAK-2 ne prévient que l'induction de CSF-2. Enfin, nous avons montré que l'epigallocatechin gallate (EGCG), la forme majeure des catéchines du thé vert, possède des effets antiangiogéniques et immunomodulateurs pouvant potentiellement expliquer une partie de ses propriétés chimiopréventives en antagonisant l'induction de l'expression des gènes de MT1-MMP, CSF-2 et de CSF-3 par la ConA.

Attendu que les MSC sont impliquées dans la vascularisation tumorale ainsi que dans l'angiogenèse, possiblement via la sécrétion des CSF-2 et CSF-3 via la voie de signalisation TLR-2/6/MT1-MMP/Src kinase et JAK/STAT3, nous suggérons que le ciblage pharmacologique de cette voie minimiserait la contribution des MSC à la vascularisation tumorale. Enfin, notre étude suggère également que l'EGCG pourrait jouer un rôle chimiopréventif en ciblant les fonctions signalétiques de la MT1-MMP.

Mots clés : Concanavaline-A, « colony stimulating factor », cellules souches mésenchymateuses, MT1-MMP, EGCG, Stat3, JAK, Src, angiogenèse, « toll-like receptors »

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer, souvent caractérisé par la présence de tumeurs malignes ou néoplasmes, est un terme général qui s'applique à un grand nombre de maladies qui affectent les fonctions de plusieurs tissus de l'organisme. Cette maladie se caractérise par une prolifération dérégulée et localisée de cellules anormales qui peuvent ainsi migrer et envahir d'autres organes à des sites distants de la tumeur primaire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est la cause majeure de la mortalité mondiale avec 7,6 millions de décès, 13% soit la mortalité totale en 2008. On estime que le nombre de décès par année dû au cancer va continuer à augmenter pour atteindre environ 13,1 millions en 2030. Au Canada, le cancer est la principale cause de décès avec environ 75700 personnes mortes en 2012 (Agence de la Santé Publique du Canada).

Le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse nécessite plusieurs modifications provenant entre autre, de l'interaction entre les gènes et des agents extérieurs que l'on peut diviser en 3 catégories : 1) cancérogènes physiques tels les rayonnements ultraviolets et les radiations ionisantes, 2) cancérogènes chimiques tels l'amiante, les composés de la fumée du tabac, l'aflatoxine ou l'arsenic, et 3) cancérogènes biologiques telles des infections dues à certains virus, parasites ou bactéries (OMS). Les recherches sur le cancer durant les dernières années ont permis d'optimiser les traitements contre cette maladie en rendant plus efficaces et plus ciblées les approches telles la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Malgré toutes ces techniques, il reste beaucoup de failles au niveau du traitement d'où la nécessité de mieux comprendre les mécanismes biochimiques propres à chaque type de cancer nous permettant ainsi de développer des stratégies thérapeutiques plus appropriées.

1.1.2 La cancérogenèse

Le développement du cancer est un processus complexe qui se déroule en trois étapes principales (Beckman et Loeb, 2005) (figure 1.1). La première étape appelée initiation consiste à une conversion de la cellule normale en une cellule initiée ou précancéreuse. Durant cette étape, la cellule normale subit des altérations et des modifications au niveau de son génome sous l'action d'agents cancérogènes comme des produits chimiques, des irradiations ou des virus (Trosko et Ruch, 1998). La deuxième étape, nommée promotion, commence quand la cellule initiée échappe du processus de réparation de l'ADN et prolifère d'une façon anormale (Weinberg, 1989). Cette étape se caractérise par une autosuffisance cellulaire face aux facteurs de croissances et une insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance (Hanahan et Weinberg, 2000). Enfin, lors de la dernière étape de progression, les cellules poursuivent leur prolifération et forment une expansion clonale qui possède les caractéristiques d'un néoplasme (Vineis, Schatzkin et Potter, 2010).

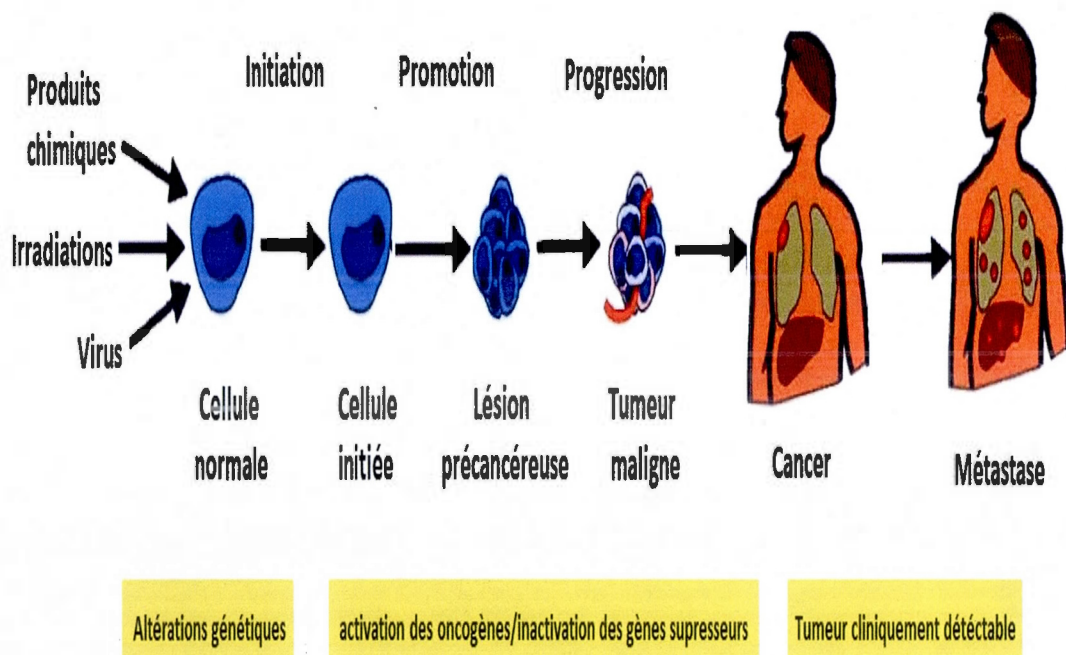


Figure 1.1 Les étapes de la cancérogenèse. La cancérogenèse est formée de trois étapes principales. La première étape est l'initiation où la cellule subit une mutation suite à l'exposition à un agent carcinogène chimique, viral ou à des radiations. La deuxième étape est appelée promotion, la cellule mutée est alors sélectionnée et prolifère grâce à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs sous l'action d'agents promoteurs. La troisième étape est la progression ; la cellule ayant acquis toutes les caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses formera un néoplasme.

[Adapté de Béliveau et Gingras, 2005]

Suite à ces stades de développement, les cellules tumorales acquièrent alors dix caractéristiques biochimiques fondamentales qui définissent leurs changements phénotypiques (figure 1.2) : résistance à l'apoptose, induction de l'angiogenèse, et insensibilité aux signaux antiprolifératifs. Elles deviennent également invasives et mènent à la formation de métastases, et se caractérisent ainsi par l'autosuffisance en signaux de croissance, une capacité de réplication illimitée, l'évasion immunitaire, la reprogrammation du métabolisme énergétique, l'instabilité génomique due à des mutations et finalement à la présence de molécules inflammatoires dans le microenvironnement tumoral (Hanahan et Weinberg, 2011).

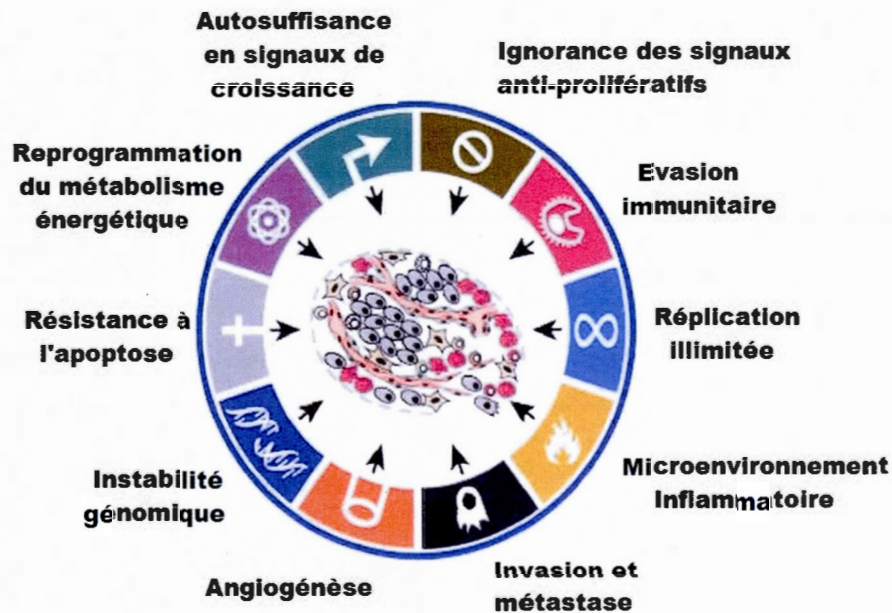


Figure 1.2 Caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses. Après différentes mutations, la cellule cancéreuse acquiert de nouveaux phénotypes responsables d'induire les différents processus qui contribuent au développement tumoral. D'après Hanahan et Weinberg (2011), il existe 10 caractéristiques fondamentales caractérisant les cellules cancéreuses citées ci-dessus.

[Adapté de Hanahan et Weinberg, 2011]

1.1.3 La métastase et l'invasion

Les tumeurs sont classées en deux catégories, bénignes ou malignes, tout dépendamment de leur niveau invasivité. Les tumeurs bénignes se développent et prolifèrent localement alors que les tumeurs malignes envahissent d'autres tissus du corps pour former d'autres foyers tumoraux par un processus appelé métastase (Hanahan et Weinberg, 2011). La métastase est d'une grande importance dans la prise en charge clinique du cancer, puisque la majorité des

cas de mortalité par cancer est associée avec une maladie disséminée plutôt qu'à la tumeur primaire. Ainsi, les patients atteints de tumeurs cancéreuses localisées ont dans la plupart des cas, un pronostic significativement meilleur que ceux possédant des tumeurs disséminées (Hunter *et al*, 2001).

Le processus métastatique est donc un processus complexe qui permet aux cellules cancéreuses suite à une série d'étapes, de coloniser d'autres tissus dans le corps avant que le cancer ne soit détectable cliniquement (figure 1.3). En premier lieu, des cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire, entrent en circulation par le phénomène d'invasion dans les voies sanguines, le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal ou les voies lymphatiques et s'arrêtent quand elles arrivent à un lit capillaire trop étroit pour leur passage. Les cellules vont ensuite quitter la circulation vers le tissu par extravasation pour former des micrométastases qui peuvent demeurer en dormance pendant une longue durée, survivre dans le microenvironnement étranger, avant qu'elles ne prolifèrent pour former des macrométastases tout en échappant à l'apoptose et à la réponse immune (Hunter *et al*, 2008). L'invasion tumorale et le processus métastatique sont étroitement liés car ils impliquent les mêmes molécules d'adhésion intercellulaire ainsi que les molécules d'interaction cellules-MEC de même que les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Hanahan et Weinberg, 2000). Plusieurs enzymes protéolytiques sont activées lors de l'invasion tumorale et la métastase. Parmi ces enzymes, les MMPs sont les plus importantes car elles sont responsables de la majorité de la protéolyse matricielle, et agissent comme des molécules régulatrices en intervenant dans des cascades enzymatiques, dans la régulation de l'angiogenèse et dans le développement tumoral (Johansson *et al*, 2000; Stamenkovic, 2000; Stetler-Stevenson et Yu, 2001).

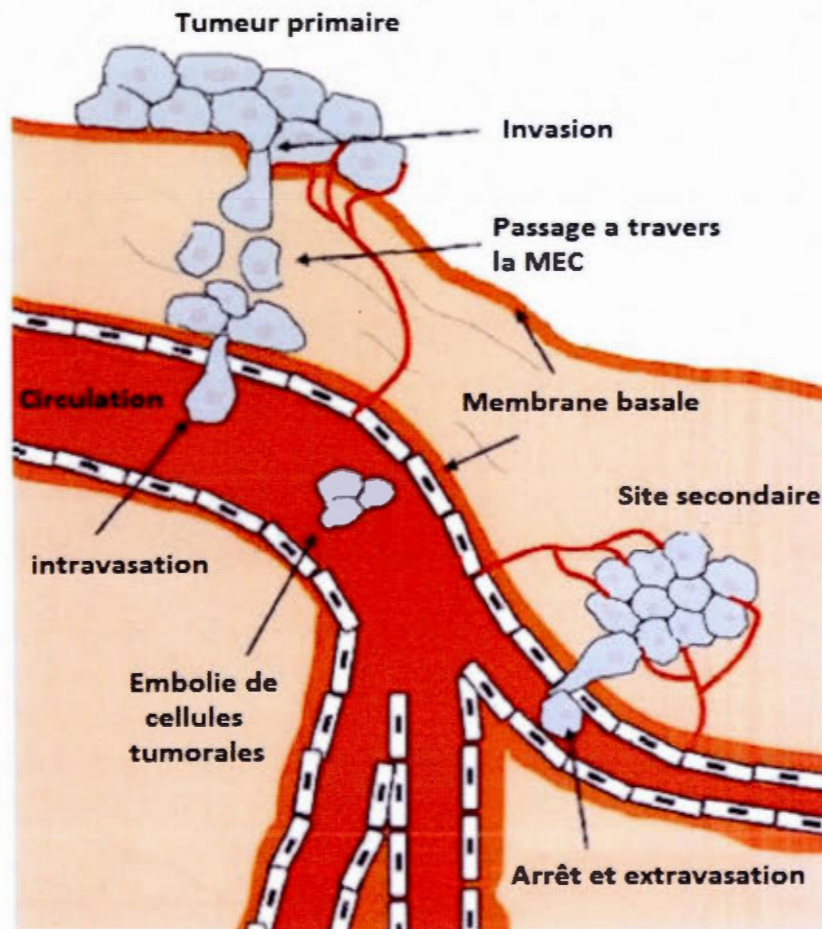


Figure 1.3 Le processus métastatique. Des cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et passent par invasion à travers la membrane pour entrer dans la circulation sanguine. Les cellules vont se diriger vers un organe cible, puis passent par extravasation vers le tissu pour former des micrométastases qui, dans des conditions adéquates, prolifèrent pour former des macrométastases.

[Adapté de Lee et Lim, 2007]

1.1.4 Angiogenèse physiologique et angiogenèse pathologique

Le réseau vasculaire est la source principale de nutriments et d'oxygène pour la croissance et la prolifération des tissus. Par conséquent, ce réseau doit former de nouveaux capillaires pour la croissance des tissus par le phénomène d'angiogenèse (Tonini *et al*, 2003). L'angiogenèse est un processus physiologique normal indispensable à la vascularisation des tissus qui se définit par la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants (Hanahan et Folkman, 1996). Ce phénomène est impliqué dans plusieurs processus physiologiques : il est le principal mécanisme de vascularisation lors de l'embryogenèse (Pepper *et al*, 2000), de la transformation cyclique de l'endomètre, dans la génération du placenta et dans les phénomènes de cicatrisation tissulaire et d'adaptation des tissus à une hypoxie ou à une inflammation locale (Folkman, 2003). Ce processus multiple commence par la dégradation de la membrane basale de la veinule post-capillaire, suivi de la migration des cellules endothéliales vers le stimulus angiogénique, la prolifération des cellules, et la formation de tubes et de ramifications. La formation de la membrane basale implique un remodelage de la matrice extracellulaire et un recrutement d'autres cellules comme les cellules musculaires lisses et les péricytes (Beck et D'Amore, 1997). Dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse est fortement contrôlée et régulée par différents facteurs solubles tels les cytokines, les protéases et certains peptides ainsi par la matrice extracellulaire qui exerce son influence grâce à ses différentes composantes et à ses propriétés mécaniques (Lelievre *et al*, 1996; Ingber et Folkman, 1989). Un dérèglement des mécanismes responsables du contrôle de l'angiogenèse soutiendrait donc le développement de plusieurs maladies comme le cancer (Folkman, 1995).

L'angiogenèse joue un rôle majeur dans le processus métastatique ainsi que dans la croissance tumorale. Ce phénomène est la source principale d'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules cancéreuses pour qu'elles puissent proliférer et migrer, et qu'une tumeur puisse dépasser une taille de 2 à 3 mm³ (Folkman, 2002). Lors d'un déséquilibre angiogénique, appelé « *switch* angiogénique », les cellules cancéreuses augmentent l'expression de différents facteurs pro-angiogéniques, comme les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et les facteurs de croissance des fibroblastes

(FGF), et diminuent l'expression d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse comme la thrombospondine-1 ou l'interféron- β (Hanahan et Weinberg, 2000). Ces facteurs pro-angiogéniques activent les cellules endothéliales pour migrer et proliférer et pour former de nouveaux tubes vasculaires à partir des vaisseaux préexistants par bourgeonnement (Scoazec, 2000). Ces facteurs activent aussi des MMPs qui libèrent des facteurs de croissance pro-angiogéniques et jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire, créant ainsi un espace pour les cellules endothéliales (Carmeliet et Jain, 2000) (Figure 1.4). Enfin, les cellules endothéliales envahissent la matrice extracellulaire et commencent à migrer et proliférer à l'intérieur de la tumeur d'une façon organisée en forme de tubules et créent une nouvelle membrane basale pour établir une stabilité vasculaire (Tonini *et al*, 2003).

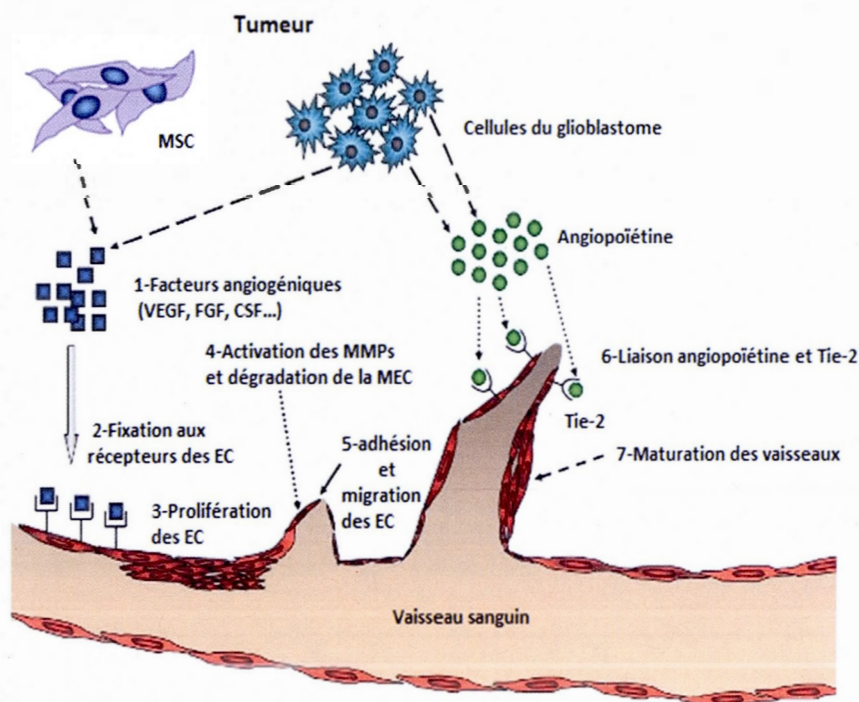


Figure 1.4 Le processus d'angiogenèse tumorale. Les MSC migrent vers la tumeur suite à une stimulation par des cytokines sécrétées par les cellules cancéreuses pour former le microenvironnement tumoral avec d'autres cellules non cancéreuses. Les MSC et les cellules cancéreuses, par exemple les cellules du glioblastome, sécrètent des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, FGF et CSF. La liaison cytokine-récepteur spécifique,

déclenche la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Après la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases matricielles (MMPs) activées par les cytokines, les cellules endothéliales s'assemblent en lumière tubulaire. Enfin, la liaison de l'angiopoïétine sur le récepteur Tie-2 permet la maturation des vaisseaux et la stabilité vasculaire.

[Adapté de Nakada *et al*, 2011]

1.2 Les cellules souches

1.2.1 Définition

Pour qu'une cellule soit considérée comme « cellule souche » elle doit remplir deux conditions essentielles. Premièrement, cette cellule doit pouvoir s'auto-renouveler sans perdre sa plasticité (Bongso et Lee, 2005). Par division symétrique, chaque cellule souche génère alors deux cellules qui resteront dans leur niche. Deuxièmement, elle doit ensuite pouvoir perdre sa plasticité et se différencier en divers sous-types cellulaires matures par division asymétrique, où les deux cellules filles possèdent alors différents phénotypes. L'une des cellules filles deviendra une cellule souche identique à sa cellule mère, l'autre se différenciera en une cellule tissulaire spécialisée. C'est du tissu environnant que viennent les messages de différenciation, quelle que soit la nature de la cellule souche différenciée (Kahn et Papillon, 2005; Dominici *et al*, 2006). Plusieurs sortes de cellules souches sont différenciées selon l'ordre décroissant de leur potentiel régénérateur. Les cellules souches totipotentes, responsables du développement d'un être humain, sont les cellules de l'embryon pendant les premières divisions de l'ovule fécondé. Les cellules souches pluripotentes, responsables de la formation de tous les tissus de l'organisme, ne peuvent aboutir à la création d'un individu complet. Enfin, les cellules souches multipotentes, présentes dans l'organisme adulte, sont à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées (Haaften et Thebaud, 2006).

1.2.2 Classification des cellules souches

Les cellules souches se divisent en deux grandes classes : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes (Figure 1.5). Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui proviennent de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade de blastocyste (5^{ème} jour après la fécondation) (Thomson *et al*, 1998). Ces cellules souches vont se différencier pour former les trois feuillets d'organisation tissulaire que sont : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme, et ainsi se différencier en tout type cellulaire composant un organisme entier (Haafte et Thebaud, 2006). Leur récolte et leur culture impliquent des débats éthiques car une intervention sur l'embryon est nécessairement délétère, ce qui rend l'étude biochimique de ces cellules compliquée (Limb *et al*, 2006). La deuxième classe des cellules souches est représentée par les cellules souches adultes appelées aussi cellules régénératrices. Ces cellules sont multipotentes car elles peuvent régénérer plusieurs types de cellules. Elles existent en faible proportion et leur rôle est de conserver et de réparer les cellules des tissus lésés (Ulloa-Montoya *et al*, 2005). Les cellules souches adultes regroupent les cellules provenant d'un adulte, d'un nouveau-né et d'un fœtus. Cette classe de cellules se divise en plusieurs sous-classes. La première comprend les cellules souches multipotentes entre l'embryon et l'adulte provenant du placenta et des tissus prélevés lors des interruptions volontaires de grossesse (Bhatia *et al*, 1997). La deuxième comprend les cellules souches chez la personne adulte. Ces cellules sont dispersées partout dans l'organisme et rassemblées dans des niches. Elles sont activées par des facteurs de croissance spécifiques et impliqués dans la régénération des tissus et des organes. Dans cette classe, on retrouve les cellules souches permettant le renouvellement de la peau, du muscle, de l'intestin, du poumon, du foie, des reins, du cœur, de l'œil et du pancréas ainsi que les cellules souches présentes dans la moelle osseuse telles les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules progénitrices des cellules endothéliales (Haafte et Thebaud, 2006). La dernière sous-classe est formée de cellules souches adultes au potentiel pluripotent comme dans le mécanisme de fusion (kahn et Papillon, 2005) et les « Multipotent Adult Progenitor Cells » (MAPC) (Liang et Bickenbach, 2002).

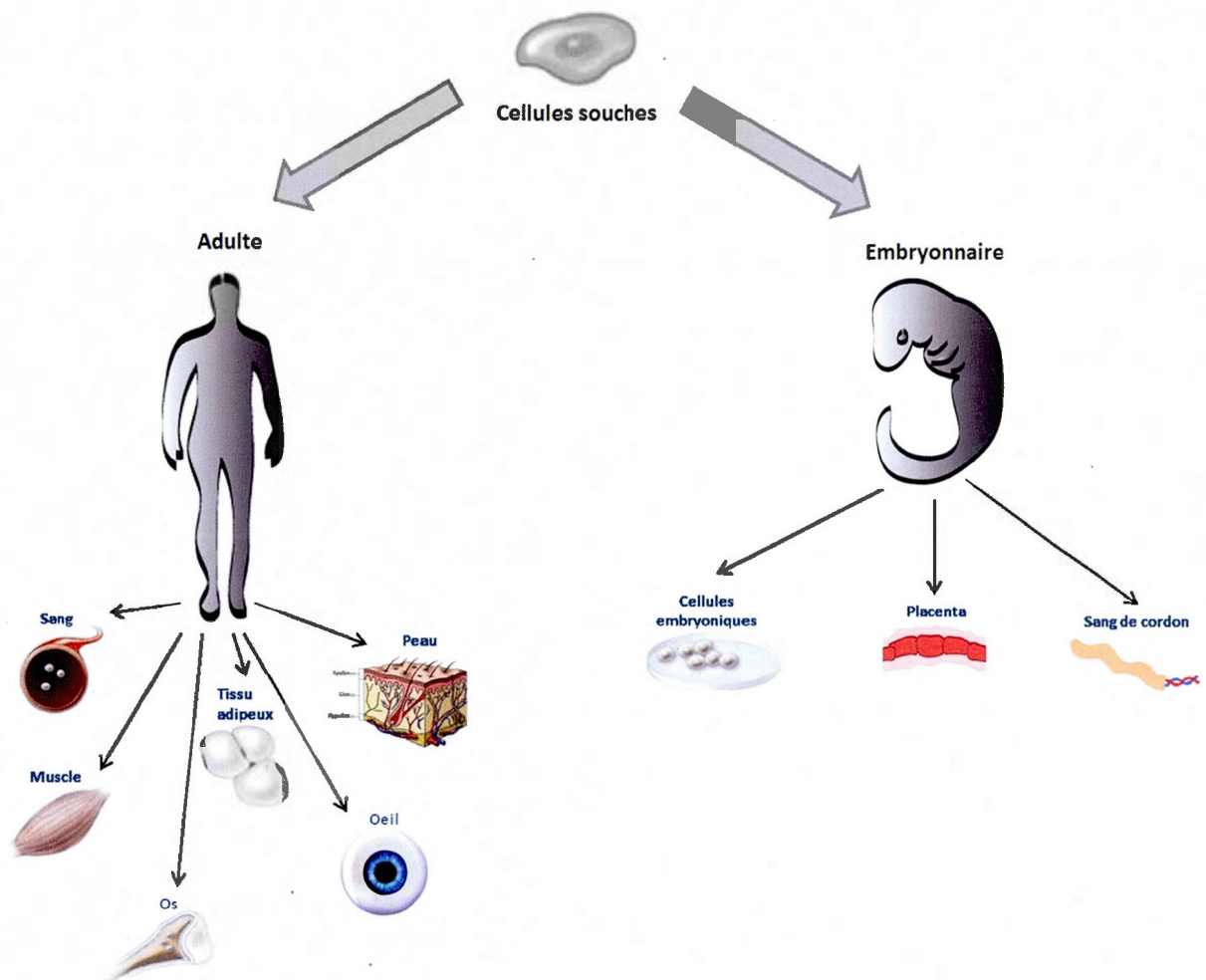


Figure 1.5 Source des cellules souches. Les cellules souches proviennent des tissus embryonnaires ou des tissus adultes. Chez l'adulte les cellules souches se retrouvent dans différents tissus sous forme de niche, tels que sang, muscle, os, tissu adipeux, œil et peau. Chez l'embryon les blastocystes sont les cellules souches principales et on peut en trouver dans le placenta et le sang de cordon.

[Adapté de Blais et Chemtob, 2011]

1.2.3 La contribution des cellules souches au développement tumoral

Les cellules souches cancéreuses jouent un rôle important dans la résistance des tumeurs aux différents traitements du cancer. En effet, ces cellules possèdent les mêmes propriétés que celles des cellules souches normales, soit la capacité de s'auto renouveler et de se différencier, et des propriétés spécifiques telles que la tumorigénicité, la capacité à former des métastases et la résistance aux traitements conventionnels grâce à leur capacité de quiescence pendant une longue période. Les cellules souches sont le résultat d'une transformation consécutive à des mutations dans les cellules souches normales, d'une cellule progénitrice qui réacquiert la capacité d'autorenouvellement, ou d'une cellule différenciée (Launay *et al*, 2012). Les marqueurs spécifiques de surfaces sont très importants pour identifier et caractériser les cellules souches cancéreuses. Seules les cellules micro-métastatiques de la moelle osseuse possèdent le phénotype $CD44^+/CD24^-$, deux molécules d'adhésion connues comme des marqueurs spécifiques du cancer du sein et des ovaires, et ont des capacités de tumorigénicité, d'autorenouvellement et de différenciation (Al Hajj *et al*, 2003). D'autres marqueurs comme le CD133 ou la prominin-1, protéine de surface exprimée à la surface des cellules souches hématopoïétiques impliqué dans l'organisation de la membrane plasmique, a été identifié récemment chez les cellules tumorales capables d'autorenouvellement (Mizrak *et al*, 2008). Les cellules souches cancéreuses représentent un nouveau défi pour les chercheurs pour les identifier dans les différentes formes de cancer, pour mieux les étudier et pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant leur prolifération.

1.2.4 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules multipotentes et ont été initialement isolées du compartiment stromale de la moelle osseuse (Friedenstein *et al*, 1966). Ces cellules peuvent également se trouver dans de nombreux types de tissus tels le tissu adipeux, la membrane synoviale, le cartilage, le périoste, le placenta et le sang de cordon (Barry et Murphy, 2004). Ces cellules possèdent la capacité de se différencier essentiellement en chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes (Jiang *et al*, 2002), en tendinocytes et ligamentocytes (Pittenger *et al*, 2002), en cardiomyocytes (Xu *et al*, 2004) et en cellules

neuronales (Guo *et al*, 2005) (Figure 1.6). Les MSC se trouvent dans la même niche que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et jouent un rôle important dans le soutien de l'hématopoïèse en sécrétant plusieurs cytokines (Ringden et Le Blanc, 2005). Sur le plan physiologique, les MSC sont impliquées dans les mécanismes de réparation tissulaire en favorisant l'angiogenèse ou le recrutement de cellules progénitrices (Martinaud *et al*, 2010). Ainsi elles sont impliquées dans l'immunomodulation de la réponse lymphocytaire T en exerçant des propriétés immunosuppressives (Di Nicola *et al*, 2002). Sur le plan pathologique, les MSC sont aussi impliquées dans la progression de différents types de cancer, comme le cancer de l'ovaire (Touboul *et al*, 2013), de la prostate (Borghese *et al*, 2013), et du sein (El-Haïbi *et al*, 2012), améliorent la croissance tumorale et la formation de métastases, et induisent des phénotypes de résistance aux médicaments anti-cancéreux (Borghese *et al*, 2013).

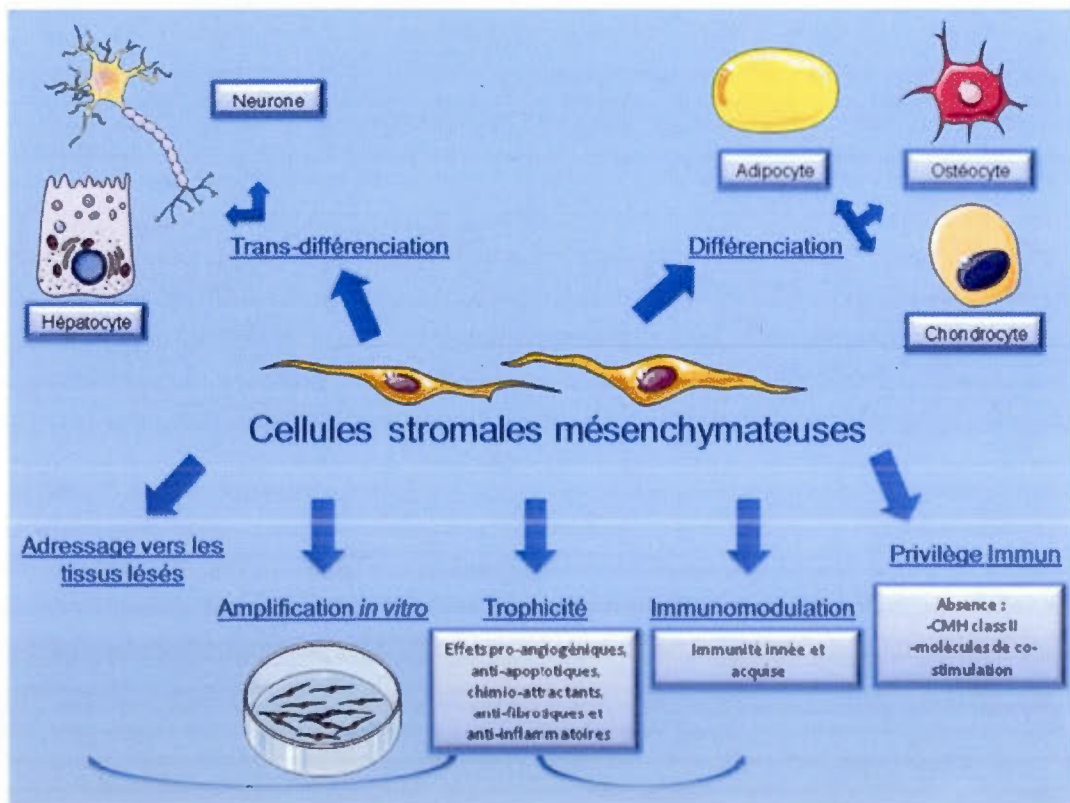


Figure 1.6 Propriétés biologiques des cellules souches mésenchymateuses. Les MSC peuvent proliférer *in vivo* et se différencier en adipocytes, ostéocytes, chondrocytes et en neurones. Elles n'expriment pas les CMH de classe II ni les molécules de co-stimulation, ce qui empêche partiellement leur destruction après la greffe. Leur capacité immunomodulatrice leur permet de moduler l'activation des cellules de l'immunité. Ainsi, elles jouent un rôle important dans la réparation tissulaire grâce à leur propriété anti-inflammatoire, pro-angiogénique et chimio-attractrice.

[Adapté de Martinaud *et al*, 2010]

1.2.5 MSC et angiogenèse

Les MSC sont impliquées dans l'angiogenèse physiologique et, à ce titre, sont au centre de différentes approches thérapeutiques, surtout dans la reconstitution des tissus où l'angiogenèse est une condition préalable (Kasper *et al*, 2007). Ainsi, il a été montré que les MSC activent la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de tubules lors de la néo-vascularisation (Gruber *et al*, 2005). De plus, les MSC servent de support à titre de péricytes, pour la croissance des cellules endothéliales en s'organisant en des structures tridimensionnelles (Markowicz *et al*, 2006).

Au niveau pathologique, les MSC possèdent la capacité de migrer de la moelle osseuse vers des tumeurs primaires et des tumeurs métastatiques en réponse aux facteurs de croissance tumoraux dans le but de contribuer à stabiliser l'endothélium vasculaire tumoral (De Luca *et al*, 2012) (Figure 1.7). Les mécanismes de contribution des MSC à l'angiogenèse sont peu documentés mais expliqués plutôt par leurs effets paracrines que par leur différenciation (Wong, 2011). En effet, les MSC sécrètent plusieurs cytokines hématopoïétiques tels le SDF-1, l'interleukine-6, l'interleukine-11, le VEGF, le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF, CSF-1), le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF, CSF-2) et le « granulocyte colony stimulating factor » (G-CSF, CSF-3) (Majumdar *et al*, 2000). Les CSF-2, CSF-3 et VEGF activent la migration des cellules endothéliales impliquées dans

la formation des nouveaux vaisseaux (Bussolino *et al*, 1991) alors que les SDF-1 et l'IL-6 se lient sur leurs récepteurs spécifiques exprimés au niveau des cellules cancéreuses et induisent différentes voies de signalisations impliquées dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (Torsvik et Bjerkvig, 2013). La capacité des MSC à se différencier contribuerait ainsi à la vascularisation des tumeurs en se différenciant en fibroblastes (Spaeth *et al*, 2009) ou en « pericytes-like » (Bexell *et al*, 2009).

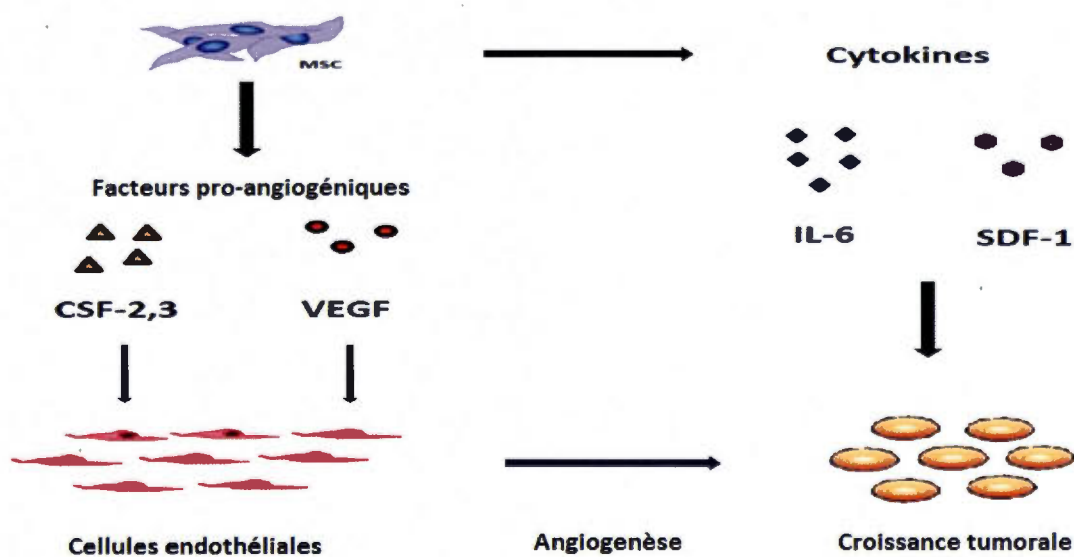


Figure 1.7 Contribution des cellules souches mésenchymateuses à la progression tumorale. Les MSC sont impliquées dans la progression tumorale par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme les CSF-2, -3, le VEGF et le FGF qui conduisent à l'activation des cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux entre les cellules tumorales nécessaires à la croissance tumorale. D'autres cytokines sont sécrétées par les MSC, comme l'IL-6 et le SDF-1 qui vont se lier aux cellules tumorales pour induire différents processus comme la prolifération qui contribue à la progression tumorale.

[Adapté de Torsvik et Bjerkvig, 2013]

1.3 Les cytokines

1.3.1 Définition

Les cytokines sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire sécrétées par plusieurs types cellulaires. Ces molécules jouent un rôle important dans la communication entre les cellules et régulent différentes fonctions biologiques telle la prolifération, le chimiotactisme, la différenciation, la survie/mort cellulaire. Aussi, les cytokines sont impliquées dans les processus d'inflammation, dans la réponse immunitaire et dans l'hématopoïèse (Dinarello, 2007). Les cytokines sont nommées les hormones du système immunitaire de par leur mode d'action autocrine, paracrine ou endocrine. En se liant à des récepteurs spécifiques de cellules cibles, elles modulent différentes voies de signalisation et régulent l'expression de plusieurs gènes (Goldsby *et al*, 2003). Les cytokines peuvent agir de façons différentes sur leurs cibles par : 1- pléiotropie, quand une cytokine a la capacité d'agir sur différents types cellulaires ou induit des effets variés dans une même cellule, 2- redondance, où plusieurs cytokines possèdent le même effet biologique, par 3- synergie, 4- antagonisme, et par 5- induction de cascades (Lee et Margolin, 2011).

Selon leurs fonctions biologiques, les cytokines peuvent se diviser en quatre grandes familles : les chimiokines, les hématopoïétines, les interleukines et la famille du TNF (Prescott *et al*, 2003) (Tableau 1.1). Les cytokines ne peuvent exercer leurs fonctions biologiques que si elles agissent comme ligand en se fixant à leurs récepteurs spécifiques de haute affinité. Ces récepteurs sont divisés en sept familles: les récepteurs de cytokines de type I, les récepteurs de cytokines de type II, les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, les récepteurs des TNF, les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs IL-17 et les récepteurs des TGF- β (Rochman et al, 2009).

Tableau 1.1 Fonctions des quatre familles de cytokine. Les cytokines jouent un rôle important dans la régulation de différents processus physiologiques et pathologiques. Ces cytokines sont classées en 4 groupes selon différents paramètres. Le tableau ci-dessous montre les différentes fonctions des 4 familles de cytokines.

[Adapté de Prescott *et al*, 2003]

Famille	Exemples	Fonctions
Chimiokines	IL-8, RANTES, MIP (protéine inflammatoire des macrophages)	Chimiotactisme et chimiocinèse des leucocytes; stimulent la migration cellulaire; attirent les phagocytes et les lymphocytes; jouent un rôle centrale dans la réponse inflammatoire
Hématopoïétines	Epo (érythropoïétine), différents facteurs stimulant les colonies	Stimulent et régulent le développement et la différenciation des cellules sanguines (hématopoïèse)
Interleukines	IL-1 à IL-18	Produites par des lymphocytes et des monocytes; régulent le développement et la différenciation d'autres cellules, surtout des lymphocytes et des cellules souches hématopoïétiques; ont souvent d'autres effets biologiques
Famille du TNF	TNF- α , TNF- β , Fas ligand	Sont cytotoxiques pour les cellules tumorales; ont beaucoup d'autres effets comme promouvoir l'inflammation, la fièvre et le choc septique; certains sont inductrices d'apoptose

1.3.2 Rôle des cytokines dans le développement tumoral

Plusieurs études ont montré une relation entre les cytokines et le cancer. Certaines cytokines comme celles libérées en réponse à l'inflammation ou à l'infection, peuvent jouer un rôle dans l'immunité et dans la progression tumorale (Oppenheim et Fujiwara, 1996). Un des mécanismes utilisés dans la thérapie du cancer fait appel à la capacité des cytokines à activer les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques ciblant les cellules cancéreuses (Yamamura *et al*, 1993). D'autres cytokines, sécrétées dans le microenvironnement de la tumeur par les cellules cancéreuses et les cellules stromales, jouent un rôle dans la pathogénicité tumorale. Ces cytokines induisent différentes voies de signalisation qui aident à la croissance et à la prolifération des cellules cancéreuses et à différents processus impliqués dans la progression tumorale comme l'invasion, l'angiogenèse et la métastase (Dranoff, 2004). La vascularisation des tumeurs est un déterminant important dans la progression tumorale car elle apporte les nutriments et l'oxygène aux cellules tumorales et facilitent la métastase. Certaines cytokines jouent un rôle principal dans l'angiogenèse. En effet, le VEGF-A agit comme un facteur angiogénique tumoral en stimulant la croissance de nouveaux vaisseaux (Geng *et al*, 2013) (Figures 1.4 et 1.7). Ainsi, d'autres cytokines comme l'IL-6 et le TNF- α sont capables d'induire la migration des neutrophiles qui sont impliqués dans la cancérogenèse en activant entre autres d'autres molécules d'adhésion et des MMPs qui participent aux processus de l'invasion et de l'angiogenèse (Dinarello, 2006). Enfin, les cytokines sécrétées lors de l'inflammation chronique peuvent contribuer à la carcinogenèse. Donc, une compréhension plus détaillée des interactions entre les cytokines et les cellules tumorales ou les cellules impliquées dans les processus de progression tumorales sera nécessaire pour une amélioration de l'immunothérapie du cancer.

1.3.3 Les facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est contrôlée par différents activateurs et inhibiteurs sécrétés par les cellules cancéreuses et saines. Ce mécanisme, appelé le « switch angiogénique », implique l'induction des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et le FGF qui vont activer le processus

d'angiogenèse et l'inhibition des facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine et l'endostatine qui vont inhiber l'angiogenèse (Nagy et Armbruster, 2012) (Figure 1.8).

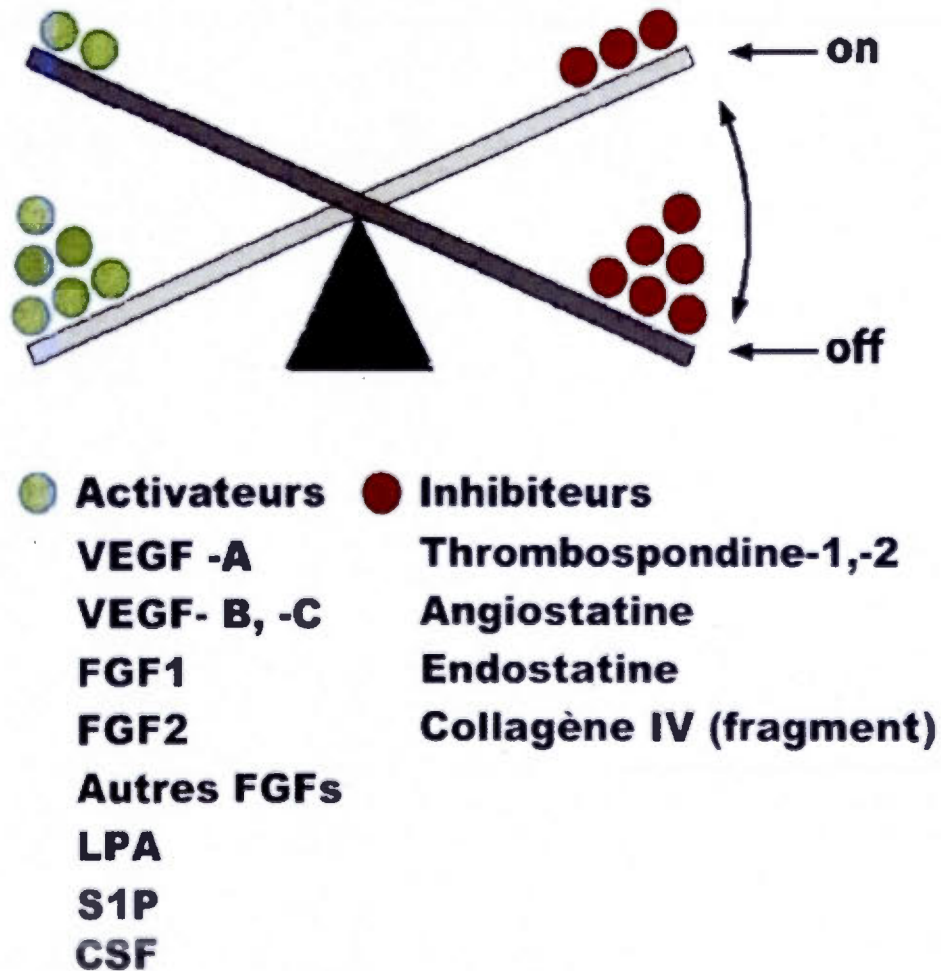


Figure 1.8 Le « switch angiogénique ». Le processus d'angiogenèse est contrôlé par une homéostasie dictée par l'équilibre entre cytokines activatrices (pro-angiogéniques) comme le VEGF, FGF, LPA, S1P et CSF et inhibitrices (anti-angiogéniques) comme l'endostatine, le thrombospondine, l'angiostatine et le collagène IV produites par les cellules normales et tumorales. Durant les processus physiologiques normaux cette balance est bien contrôlée.

Alors que dans le cas des cellules cancéreuses on observe une sécrétion augmentée des facteurs pro-angiogéniques qui favorisent l'angiogenèse tumorale nécessaire à la progression.

[Adapté de Weinberg, 2007]

Plusieurs facteurs sécrétés par les cellules dans le microenvironnement tumoral sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale. D'abord, la famille des facteurs de croissances vasculo-endothéliaux, dont le VEGF, qui sont impliqués dans la croissance des cellules endothéliales (Ferrara, 2002). Le VEGF est considéré le régulateur principal des processus angiogéniques au niveau physiologique et pathologique (Risau et Flamme, 1995). Les molécules de VEGF-A se fixent sur deux types de récepteurs spécifiques, le FLK1 (ou VEGFR2) ou le FLT1 (ou VEGFR1) (Cross et Claesson-Welsh, 2001). La liaison au VEGFR2 induit l'activation de différentes voies de signalisation, dont la voie MAP kinase, alors que le VEGFR1 induit la migration des monocytes et le recrutement de cellules hématopoïétiques au sein des foyers néo-angiogéniques pour faciliter le processus de la néo-vascularisation (Rafii *et al*, 2002). Ensuite, la famille des facteurs de croissances fibroblastiques (FGF) qui est formée de pas moins de 23 membres (Javerzat *et al*, 2002). Ces facteurs possèdent quatre récepteurs membranaires spécifiques à activité tyrosine kinase FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4 (Ornitz et Itoh, 2001). La famille des FGF, particulièrement les FGF1 et FGF2, activent la croissance cellulaire, la prolifération, la migration et l'angiogenèse deux fois plus que le VEGF (Lieu *et al*, 2011). De plus, ces molécules sont impliquées dans l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules endothéliales comme la voie MAP kinase et P38 kinase qui sont impliquées dans la morphogenèse tubulaire des vaisseaux capillaires (Matsumoto *et al*, 2002). D'autres familles de cytokines sont également impliquées dans l'angiogenèse tumorale, comme la famille des « colony stimulating factor ». Cette famille est composée de trois membres: les macrophages « colony-stimulating factor » (M-CSF, CSF-1), les granulocytes « colony-stimulating factor » (G-CSF, CSF-3) et les granulocytes macrophage « colony-stimulating factor » (GM-CSF, CSF-2). Particulièrement, les CSF-2 et les CSF-3 ont la capacité d'activer les cellules endothéliales pour déclencher un programme de différenciation lié à l'angiogenèse

(Bussolino *et al*, 1991). Enfin, on trouve la famille des angiopoïétines formée de cinq membres : Ang1, Ang2, Ang3, Ang4 et Ang5 desquels l'Ang1 seulement semble impliquée dans l'angiogenèse tumorale et dans le recrutement des cellules mésenchymateuses et la maturation des vaisseaux sanguins (Yancopoulos *et al*, 2000).

1.3.4 Les « colony stimulating factors »

Les CSF sont des facteurs de croissance hématopoïétiques impliqués principalement dans la régulation de l'hématopoïèse, dans l'adaptation aux infections et dans la progression tumorale (Rusthoven, 1991). Leur spécificité d'action requiert des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules cibles. Ces facteurs vont intervenir dans le maintien de l'homéostasie et dans l'adaptation à certaines situations pathologiques (Dranoff *et al*, 1994). Récemment, il a été démontré que les facteurs de croissance hématopoïétiques jouent un rôle important dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. En effet, cette activité angiogénique des cytokines hématopoïétiques affecte certaines fonctions des cellules endothéliales (Ribatti, 2012). En plus, des récepteurs spécifiques pour chacune des cytokines CSF-2 et CSF-3 ont été trouvés à la surface des cellules endothéliales (Bussolino *et al*, 1989). La famille des CSF contribue à la progression tumorale au niveau de plusieurs tissus grâce à leur présence dans l'environnement tumoral, et régule différents processus comme l'angiogenèse, la métastase et l'invasion par différentes voies de signalisation (Bussolino *et al*, 1991 ; Sielska *et al*, 2013).

La famille des CSF est formée de trois membres qui sont impliqués dans l'hématopoïèse et l'inflammation. D'abord, le CSF-1, est un facteur de croissance pléiotropique qui régule la survie, la prolifération et le chimiotactisme de la lignée des monocytes/macrophages, leur différenciation en macrophage et l'activation des macrophages. (Pixley et Stanley, 2004; Glenn et Van der Geer, 2008). Le CSF-1 est impliqué dans le développement des lignées myéloïdes et dans la régulation de monocytes/macrophages dans plusieurs tissus (Cecchini *et al*, 1994). De part de sa contribution dans la pathogénicité de plusieurs maladies comme les maladies inflammatoires et immunes, le CSF-1 contribue aussi au cancer des différents tissus (Chitu et Stanley, 2006). En effet, il appert que le CSF-1 se trouve en concentration élevée

dans les microenvironnements tumoraux et que les cellules cancéreuses sont capables d'exprimer le CSF-1 et son récepteur pour réguler leur croissance, la progression tumorale et la métastase. Par exemple, dans les cellules cancéreuses du sein, l'expression de CSF-1 accélère la progression tumorale et augmente la métastase pulmonaire (Lin *et al*, 2001). Le deuxième membre de cette famille, le CSF-2, est une glycoprotéine de 23 kDa qui affecte les cellules immunes et non immunes en induisant la prolifération des monocytes/macrophages, lymphocytes T, kératinocytes et des cellules endothéliales (Ruef et Coleman, 1990), ainsi que la différenciation des macrophages, granulocytes et des précurseurs des éosinophiles (Disis *et al*, 1996). Le CSF-2 se trouve en concentration élevée dans différents tissus tumoraux et contribue aussi aux processus de l'angiogenèse et de la progression tumorale (Mantovani et Sica, 2010). En effet, le CSF-2 induit la formation des capillaires par l'activation des cellules endothéliales, et les tubules par l'activation des cellules endothéliales et des fibroblastes (Krubasik *et al*, 2008). De plus, il a été montré que le CSF-2, de par son action autocrine et/ou paracrine, régule la prolifération du gliome (Curran *et al*, 2011). Enfin, le dernier membre de cette famille, le CSF-3, est une glycoprotéine de 18 kDa qui joue un rôle dans la prolifération, différenciation et la migration des cellules granulocytaires, en particulier envers les neutrophiles (Kerst *et al*, 1993). Le CSF-3 induit la phagocytose, inhibe l'apoptose et augmente le processus de chimiotactisme (Pajkrt *et al*, 1997). Au niveau pathologique, le CSF-3 est sécrété en grande quantité par les cellules tumorales et contribue fortement à la progression tumorale (Takagi *et al*, 2010). Enfin, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré le rôle du CSF-3 dans l'activation de la prolifération des cellules cancéreuses, la migration, l'invasion, l'angiogenèse, le recrutement des neutrophiles et l'inhibition de l'apoptose (Kanno *et al*, 2013).

1.4 Les processus cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse tumorale

1.4.1 Les récepteurs « Toll Like Receptors »

Les « Toll Like Receptors » (TLR) sont des récepteurs glycoprotéiques de type I exprimés au niveau des cellules immunitaires tels les macrophages et les cellules dendritiques. Ils sont impliqués dans la réponse immunitaire qui induit la sécrétion des cytokines inflammatoires,

des chimiokines et des interférons (Kawai et Akira, 2005). Les TLR sont caractérisés par un domaine cytoplasmique, le domaine TIR (Toll-IL-1 Receptor), grâce à leur forte homologie avec le domaine cytoplasmique des récepteurs des IL-1 et d'un domaine extracellulaire comportant de nombreux motifs riches en leucine LRR (Leucine Rich Repeat) (Bowie et O'Neill, 2000). Le domaine extracellulaire donne la spécificité de reconnaissance aux différents ligands grâce à ses nombreux domaines LRR. La partie cytoplasmique des TLR est impliquée dans l'activation de différentes voies de signalisation en faisant intervenir les protéines adaptatrices MyD88 (Myeloid Differentiation Factor), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing $\text{INF}\beta$), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) et TRAM / TICAM2 (TRIF related adaptor molecule / TIR domain adaptor molecule 2) (Akira et Takeda, 2004). Deux voies ont été décrites à ce jour : la première est MyD88-dépendante et est impliquée dans la synthèse des cytokines inflammatoires, et la deuxième est TRIF-dépendante et conduit à la synthèse des IFN inductibles (Kawai et Akira, 2007).

La famille des TLR comprend onze membres chez l'humain (Figure 1.9) qui agissent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères (TaKeuchi *et al*, 2001). D'abord, le TLR2 qui est capable de reconnaître différents composés telles les lipoprotéines, les lipopeptides, les peptidoglycanes et l'acide lipoteichoïque des bactéries Gram positives. Le TLR2 forme des dimères hétérophiles avec le TLR1 et le TLR6. Ces deux dernières molécules sont reliées structurellement au TLR2 pour accomplir leurs fonctions. En effet, l'hétérodimère TLR1/TLR2 reconnaît les lipopeptides triacylés et l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaît les lipopeptides diacylés des bactéries pour synthétiser des cytokines inflammatoires (Takeda et Akira, 2005). De plus, l'hétérodimère TLR2/TLR6 joue un rôle important dans l'activation de différentes voies de signalisation dans les MSC (Auletta *et al*, 2012). En effet, il possède la capacité de reconnaître la lectine de *Canavalia ensiformis* (concanavaline A, ConA) qui va activer la sécrétion des cytokines inflammatoires (Unitt et Hornigold, 2011) qui contribuent aux fonctions angiogéniques, prolifératives et immunomodulatrices des MSC (Scheibe *et al*, 2012 ; Borghese *et al*, 2013). Le TLR3, exprimé à la surface des endosomes, est capable de lier l'ARN double brin généré par les virus et induit l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Takeda et Akira, 2005). Le TLR4 est associé à la protéine MD-2 pour mettre en place la réponse inflammatoire innée (Fenton et Golenbock, 1998). Ce récepteur lie

spécifiquement le LPS, reconnaît les « Heat Shock Proteins » (HSP-60 et HSP-70) et certains oligosaccharides. Le TLR5 est un récepteur spécifique de la flagelline. En effet, la flagelline active le TLR5 des cellules épithéliales du poumon pour induire la production des cytokines inflammatoires (Takeda et Akira, 2005). Le TLR7 et le TLR8 sont homologues, exprimés à la surface des endosomes et possèdent la capacité de lier les acides nucléiques surtout l'ARN simple brin (Hemmi *et al*, 2002). Le TLR9, exprimé sur l'endosome, lie l'ADN des bactéries et des virus et semble impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes (Kawai et Akira, 2005). Le TLR10 est probablement fonctionnel chez les humains alors que le TLR11 est non fonctionnel en raison d'un codon stop qui abroge son expression (Takeda et Akira, 2005).

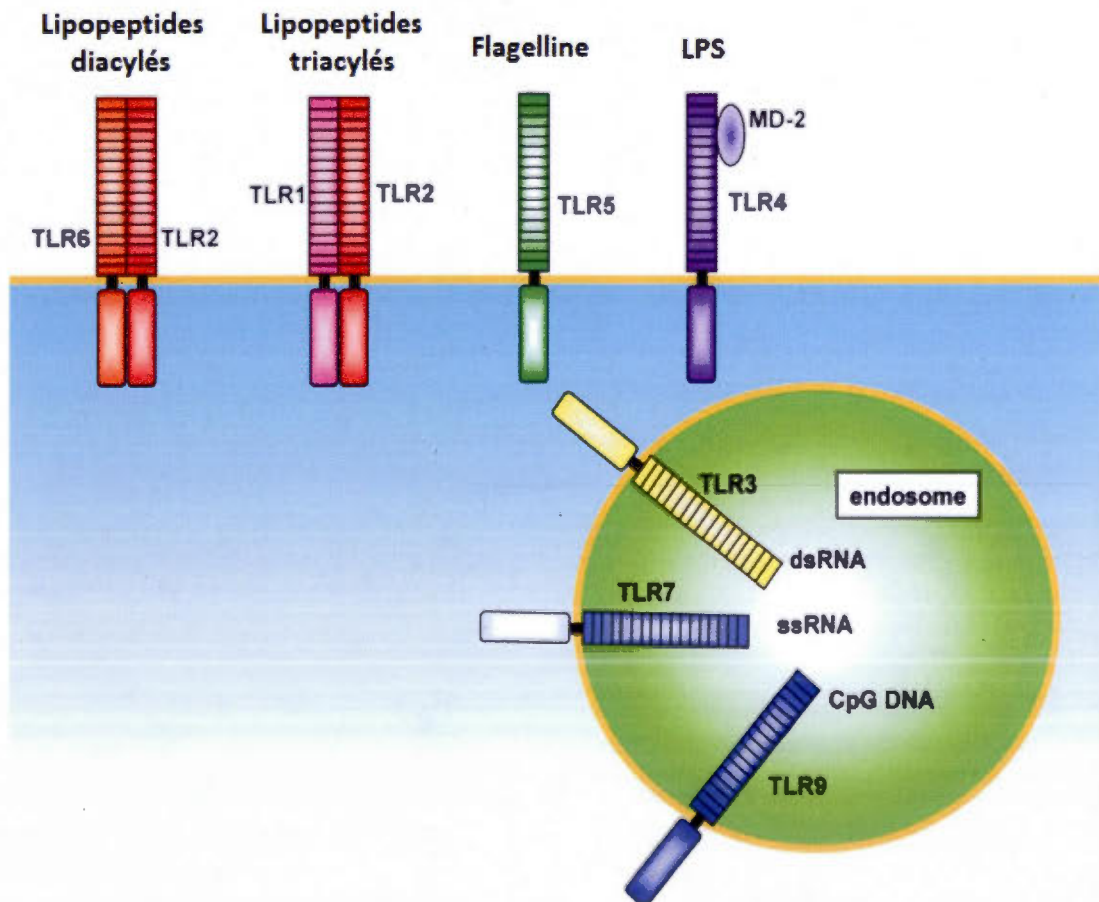


Figure 1.9 Les « Toll-Like Receptors » et leurs ligands. Les TLR sont classés selon leur différence structurale responsable de la fixation de différents ligands. Le TLR-2 est capable de reconnaître des lipopeptides et des lipoprotéines et forme des hétérodimères avec le TLR-1 et le TLR-6 pour lier des lipopeptides triacylés et diacylés. Le TLR-5 forme un récepteur spécifique des flagellines. Le TLR-4 est MD-2-dépendant pour fixer le LPS. Les TLR-3, -7 et -9 se retrouvent à la surface de l'endosome parce qu'ils sont des récepteurs spécifiques d'ADN et d'ARN.

[Adapté de Takeda et Akira, 2005]

1.4.2 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est composée d'un grand nombre de molécules comme les glycoprotéines, le collagène, les protéoglycanes et les glycosaminoglycans (Timpl et Brown, 1996). Elle forme un support physique pour la cellule et forme une structure dynamique de signalisation cellulaire (Egeblad *et al*, 2010). La dégradation de la MEC par les métalloprotéases matricielles (MMPs) joue un rôle important dans différents processus biologiques comme l'adhésion cellulaire, la prolifération, la migration, l'apoptose, l'invasion et l'angiogenèse (Nyalendo *et al*, 2007). Ainsi, la dégradation de la MEC permet la libération de plusieurs facteurs de croissance ancrés dans la membrane comme le VEGF et le FGF qui contribuent à la signalisation cellulaire et à la progression tumorale (Forget *et al*, 1999). Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes qui sont capables de dégrader la majorité des composantes de la MEC. Les MMPs sont souvent surexprimées au sein des tumeurs et contribuent aux multiples processus associés à la progression tumorale : métastase, invasion, angiogenèse et prolifération (Deakin et Chaplain, 2013).

1.4.3 Classification des métalloprotéases

Les MMPs sont codées par vingt-quatre gènes identifiés dans le génome humain, mais qui donnent lieu à vingt-trois protéases de types MMP. En effet, la MMP-23 est présente sous deux formes : MMP-23A et MMP-23B. Ces deux molécules sont strictement identiques mais

sont transcrites par deux gènes différents (Velasco et al, 1999; Folgueras et al, 2004). Les MMPs possèdent différents domaines dont trois sont conservés dans toutes les MMPs. D'abord, le prodomaine est responsable du maintien de la forme inactive des MMPs (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990; Bode et al, 1999). L'activation des MMPs nécessite donc le clivage du prodomaine par d'autres protéases comme la furine, d'autres MMPs ou des protéases à sérines (Sternlicht et Werb, 2001). Ensuite, le domaine catalytique est responsable d'effectuer les fonctions hydrolytiques spécifiques des MMPs. Par exemple, ce domaine chez la MMP-2 et la MMP-9 est responsable de leur spécificité à dégrader la gélatine (Brinckerhoff et Matrisian, 2002). Enfin, le domaine hemopexine C-terminal, retrouvé chez toutes les MMP sauf MMP-7 et MMP-26, est responsable de la liaison aux substrats ainsi qu'à leurs inhibiteurs spécifiques (TIMPs) (Stamenkovic, 2000). Les MMPs sont classées selon leurs différences structurales en six groupes (Figure 1.10). Le premier groupe, incluant les collagénases (MMP-1, MMP-8, et MMP-13), sont impliquées dans la dégradation des collagènes fibrillaires incluant les collagènes de type I, II et III, et jouent un rôle important dans le remodelage et la calcification des os (Sternlicht et Werb, 2001). Le deuxième groupe, les matrilysines (MMP-7 et MMP-26), sont exprimées chez les cellules cancéreuses d'origine épithéliale et peuvent dégrader la gélatine et la fibronectine. Ainsi, le MMP-7 joue un rôle crucial dans la survie et l'invasion tumorale. Le troisième groupe, regroupent les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), sont impliquées dans la dégradation de la gélatine et du collagène de type IV et V de la membrane basale. La MMP-2 joue un rôle important dans l'ostéogenèse alors que la MMP-9 produit par les cellules tumorales joue un rôle important dans la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique et de dans la métastase (Demeule *et al*, 2004). Le quatrième groupe, les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11), sont produites par les cellules saines et cancéreuses. Elles sont impliquées dans la dégradation des glycoprotéines et des peptidoglycanes (Chantrain *et al*, 2002; He *et al*, 2009). La MMP-11 sécrétée par les cellules cancéreuses joue un rôle mineur dans la dégradation de la MEC (Rio, 2005). Le cinquième groupe, les MMPs transmembranaires ou MT-MMP (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25, aussi nommées MT1-MMP à MT6-MMP). Ces MMPs sont ancrées dans la membrane plasmique par leur domaine transmembranaire et dégradent plusieurs composantes de la MEC. Elles sont également impliquées dans l'activation d'autres MMPs et elles peuvent être activées par des facteurs de croissance. A ce titre, la MT1-MMP joue un

rôle dans l'angiogenèse et est capable d'activer la forme latente de la MMP-2 (Brinckerhoff et Matrisian, 2002; Visse et Nagase, 2003). Le dernier groupe est plutôt hétérogène et comprend les MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27, -28. La MMP-12 dégrade l'élastine et elle est produite par les macrophages dont elle régule la migration (Hautamaki *et al*, 1997). La MMP-19 dégrade les composantes de la lame basale et du tissu conjonctif. Elle est sous-exprimée dans le cas de carcinomes invasifs (Jost *et al*, 2006). La MMP-20 dégrade l'amélogénine et est impliquée dans la régulation de la matrice amélaire et de sa minéralisation (Chaussin-Miller *et al*, 2006). La MMP-21 joue un rôle important dans l'embryogenèse surtout au niveau des cellules neuronales (Marchenko *et al*, 2003). La MMP-23 joue un rôle dans la régulation cellulaire des tissus génitaux (Velasco *et al*, 1999). La MMP-27 est surexprimée dans les os et elle est impliquée dans l'ostéogenèse (Kevorkian *et al*, 2004). La MMP-28 joue un rôle dans l'hémostase et la cicatrisation parce qu'elle est exprimée par les kératinocytes (Visse et Nagase, 2003).

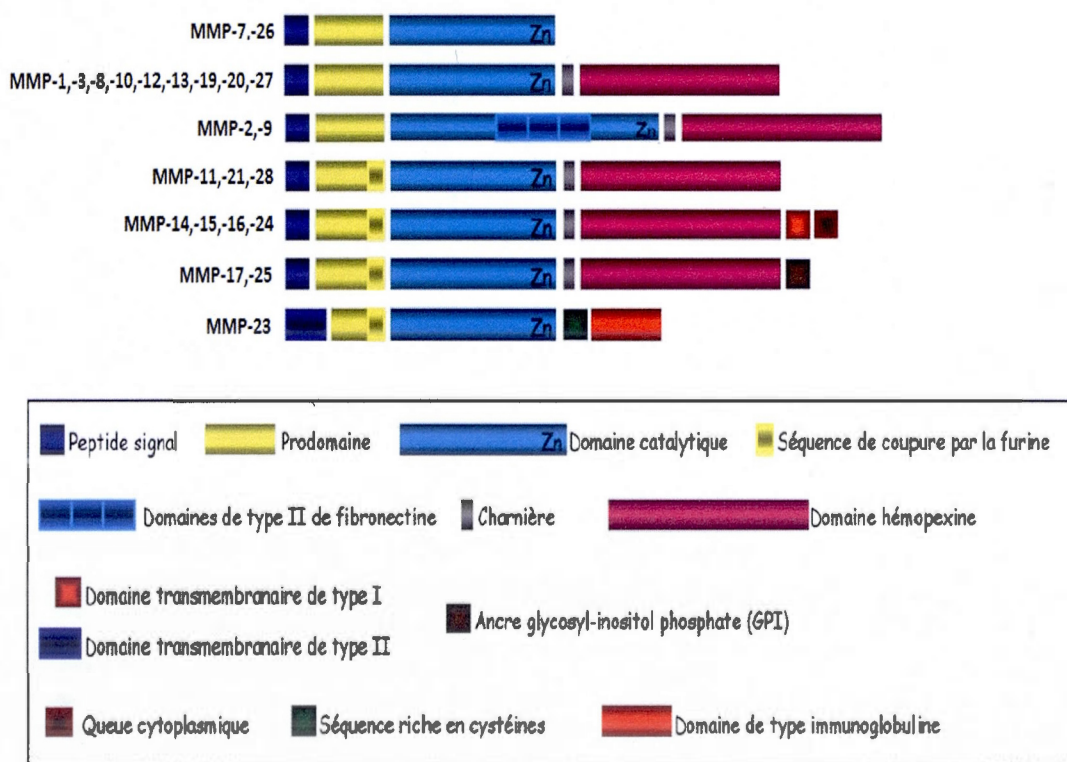


Figure 1.10 Classification des métalloprotéases matricielles selon leurs domaines. Les MMPs sont classées en 7 groupes selon leurs domaines variés. Les MMPs transmembranaires se divisent en deux groupes alors que les MMPs solubles en cinq. Le prodomaine, le domaine catalytique et le domaine hémapexine sont conservés pour toutes les MMPs sauf pour les MMP-7 et MMP-26 qui possèdent uniquement le prodomaine et le domaine catalytique.

[Adapté de Nagase et Woessner, 1999]

1.4.4 Les fonctions de la MT1-MMP

La MT1-MMP fait partie de la famille des MMPs membranaires. Elle possède plusieurs domaines nécessaires pour ses différentes fonctions cellulaires (Figure 1.11). D'abord, un prodomaine responsable du maintien de sa forme latente inactive et qui est clivable par des protéases telle la furine (Sternlicht et Werb, 2001). Puis, le domaine catalytique, qui se retrouve à l'extérieur de la cellule et possède un site de liaison de l'ion Zn^{2+} essentiel à l'activation de la protéase (Strongin, 2010). Ce domaine est impliqué dans l'activation de la pro-MMP-2 et contribue à la dégradation de la MEC, par l'intermédiaire d'un complexe trimoléculaire impliquant MT1-MMP, TIMP-2 (inhibiteur de la MMP-2) et pro-MMP-2. Une fois le complexe formé, le domaine catalytique de la MT1-MMP clive le prodomaine de la pro-MMP-2 (Apte *et al*, 1997). De plus, ce domaine est capable de cliver les différentes molécules de la MEC tels les collagènes de type I, II et III, la laminine 1 et 5, la fibronectine, la vibronectine et la fibrine (Williams et Coppelino, 2011). Ensuite, le domaine « charnière », dont le rôle est encore inconnu mais qui semble également réguler la protéolyse péricellulaire (Osenkowski *et al*, 2005). Le domaine hémapexine de la MT1-MMP, responsable de sa liaison aux collagènes de type I, régule également les interactions de la MT1-MMP avec différentes protéines membranaires comme le CD44 (Gingras et Béliveau, 2010). Le domaine transmembranaire, conservé parmi les MMPs transmembranaires, est responsable de l'ancrage des MT1-MMP à la membrane plasmique (Brinckerhoff et Matrisian, 2002). Enfin, le domaine cytoplasmique contribue à l'activation de différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées dans plusieurs processus biologiques dont la voie RhoA/ROK

(annabi *et al*, 2005), Ras-MeK-Erk (Gingras et Béliveau, 2010), RhoA/Rac-1 (Ando *et al*, 2011) et Jak/Stat3 (Akla *et al*, 2012). Finalement, la MT1-MMP contribue aux processus de l'inflammation et de la réponse immunitaire grâce aux cytokines qui font partie de ses substrats tels le TNF- α , le CTGF et l'IL-8 (McQuibban *et al*, 2001; Tam *et al*, 2004). Au niveau des MSC, la MT1-MMP joue aussi un rôle important dans la mobilisation de ces cellules (Karow *et al*, 2009).

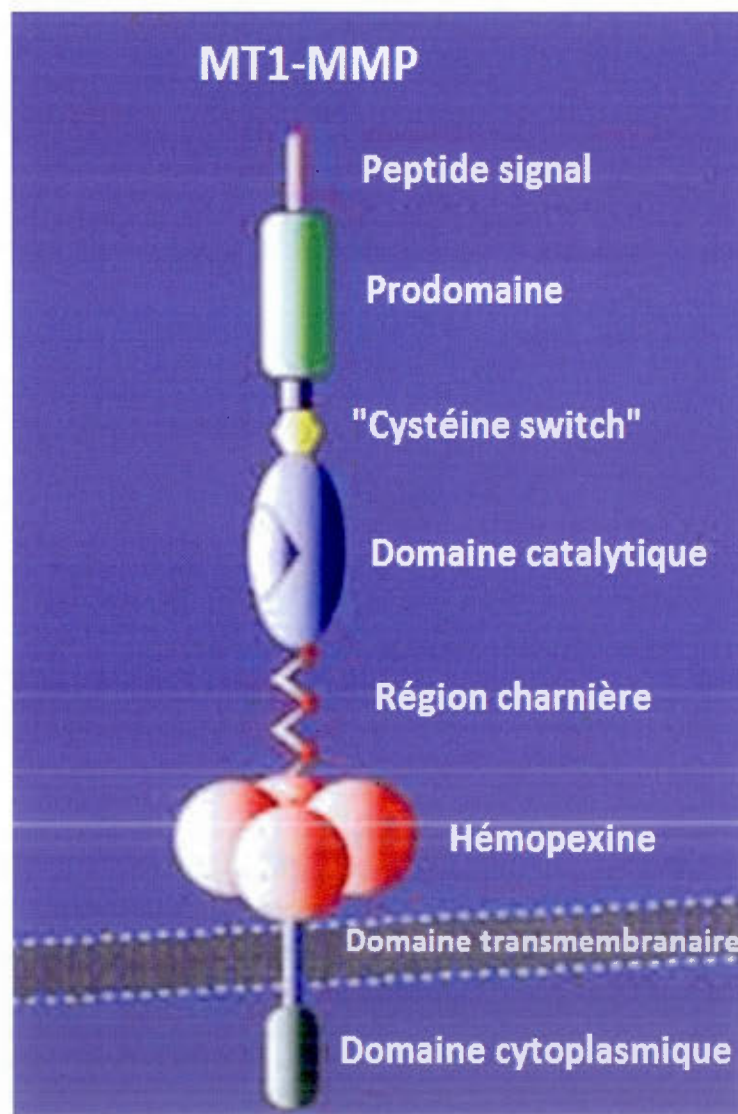


Figure 1.11 Structure de la MT1-MMP. La MT1-MMP (MMP14) est une protéase transmembranaire possédant plusieurs domaines. Le prodomaine qui maintient la forme inactive de l'enzyme, le domaine « cystéine switch » qui forme le site de clivage du prodomaine, le domaine catalytique responsable de l'activation de la pro-MMP2 et de la dégradation de la MEC, la région charnière qui semble impliquée dans la régulation de la protéolyse péricellulaire, le domaine hémapexine impliqué dans l'interaction avec d'autres molécules comme le collagène, le domaine transmembranaire nécessaire pour l'ancrage de la molécule dans la membrane et le domaine cytoplasmique qui induit différentes voies de signalisation intracellulaires.

[Adapté de Koziol *et al*, 2012]

1.4.5 La contribution de la MT1-MMP à la signalisation cellulaire

La contribution de la MT1-MMP à la signalisation cellulaire est attribuable à son domaine cytoplasmique permettant la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Ce domaine joue un rôle important dans la migration cellulaire. En effet, la délétion du domaine cytoplasmique de MT1-MMP inhibe la migration des macrophages indépendamment de son activité protéolytique (Sakamoto et Seiki, 2009). Ainsi, l'internalisation de la MT1-MMP à la surface membranaire est due aux acides aminés leu⁵⁷¹⁻⁵⁷², leu⁵⁷⁸⁻⁵⁷⁹ et tyr⁵⁷³ qui font parti de son domaine cytoplasmique. Une mutation au niveau de ces acides aminés perturbe l'internalisation de la MT1-MMP à la surface mais celle-ci n'affecte pas son activité catalytique (Uekita *et al*, 2001). Enfin, il a été montré que le domaine cytoplasmique de MT1-MMP permet l'activation de plusieurs voies de signalisation telle la voie d'AGE/RAGE impliquée dans les complications vasculaires du diabète (Kamioka *et al*, 2011).

1.4.6 La contribution de la MT1-MMP au développement tumoral

La MT1-MMP, surexprimée dans différentes cellules cancéreuses, joue un rôle majeur dans les processus biologiques contribuant à la progression tumorale. En effet, cette MMP

promeut la survie cellulaire, et induit la prolifération, l'angiogenèse tumorale, la métastase et l'invasion (Sina *et al*, 2009). De plus, elle dégrade de la MEC conduisant à la libération de différentes cytokines ancrées dans la membrane (Kessenbrock *et al*, 2010). La surexpression de la MT1-MMP dans les cellules cancéreuses induit l'angiogenèse tumorale en régulant la sécrétion des facteurs de croissance comme le VEGF, responsable de l'activation des cellules endothéliales (Sounni *et al*, 2002). Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP joue un rôle crucial dans l'activation de voies de signalisations pro-tumorales impliquées dans la migration (Sakamoto et Seiki, 2009) et la survie cellulaire (Fortier *et al*, 2008). Par exemple, la MT1-MMP contribue à la mobilisation et à la survie des MSC qui jouent un rôle dans le processus d'angiogenèse tumoral (Annabi *et al*, 2003). De par sa capacité à dégrader plusieurs composantes de la MEC, d'une façon directe ou indirecte via l'activation de la pro-MMP-2, la MT1-MMP facilite l'invasion des cellules cancéreuses à travers la membrane pour passer dans la circulation sanguine. La phosphorylation de l'acide aminé Thr⁵⁶⁷ semble responsable de cette fonction (Williams et Coppolino, 2011). La MT1-MMP joue aussi un rôle dans l'activation des métastases en clivant la métastine, une protéine qui joue un rôle d'inhibiteur de métastases des mélanomes (Lee *et al*, 1996).

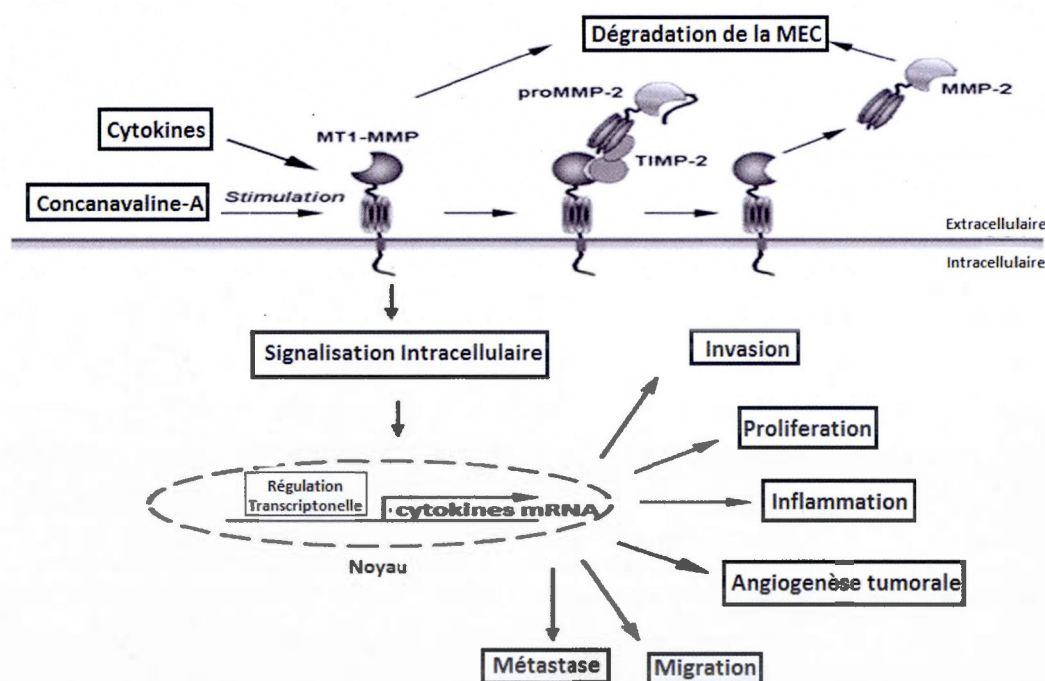


Figure 1.12 Induction de différents processus tumoraux par la MT1-MMP. L'activation de MT1-MMP par des cytokines ou par une lectine comme la concanavale-A (ConA) conduit à l'activation de la pro-MMP2 qui est impliquée dans la dégradation de la MEC et dans l'invasion tumorale. Aussi, elle contribue à l'activation de différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées dans les processus biologiques de la progression tumorale incluant l'invasion, la prolifération, l'inflammation, l'angiogenèse tumorale, la migration et la métastase.

[Adapté de Sina *et al*, 2009 ; Akla *et al*, 2012]

1.4.7 La voie de signalisation JAK/STAT

La famille des Janus kinases (JAK) comprend 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces protéines sont liées à la partie cytoplasmique des récepteurs membranaires de types I et II qui sont responsables de fixer différentes cytokines sur leurs domaines extracellulaires (Quintás-Cardama *et al*, 2011). Cette liaison cytokine-récepteur induit une trans-phosphorylation des protéines JAK qui vont devenir actives pour induire la phosphorylation d'autres protéines intra-cytoplasmiques comme STAT (Agrawal *et al*, 2011). Les protéines JAK sont formées de sept domaines conservés. Le domaine JH1 (JAK Homology 1) à l'extrémité C-terminale représente le domaine catalytique impliqué dans l'autorégulation de l'activité kinase. Ce domaine est riche en résidus aminés tyrosines nécessaires pour l'activation des membres de la famille des JAK (Liu *et al*, 1997). Ainsi, la phosphorylation de ces tyrosines modifie la conformation des JAK leur permettant de lier différents substrats et de les phosphoryler (Leonard et O'Shea, 1998). Le domaine JH2 appelé aussi domaine pseudo-kinase ne possède pas d'activité catalytique mais il est nécessaire pour une activité kinase normale et semble réguler l'activité de JH1. Les domaines JH3 et JH4 forment le domaine SH2 (« Src Homology Domain 2 ») qui est responsable de la reconnaissance et de l'attachement aux résidus tyrosines phosphorylés (Bandaranayake *et al*, 2012). Enfin, les domaines JH4 à JH7 qui forment un complexe appelé FERM (« Four-point-one, Ezrin,

Radixin, Moesin ») présent à l'extrémité N-terminale et qui est responsable de l'association de JAK avec le récepteurs de cytokines ou d'autres protéines comme les kinases (Giordanetto et Kroemerm 2002).

La famille des Stat (« Signal Transducers and Activators of Transcription ») est formée de sept membres : Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b et Stat6. Ces protéines possèdent quatre domaines conservés. Le domaine DBD (« DNA binding domain ») permet la liaison de ces facteurs de transcription à l'ADN ; le domaine SH2 qui permet l'interaction de Stat avec les tyrosines phosphorylées du récepteur des cytokines ou avec les JAK phosphorylés. Celui-ci joue un rôle dans la dimérisation de Stat (Hebenstreit *et al*, 2006) ; le domaine de transactivation (TAD) qui régule l'activité de Stat et permet le recrutement de co-activateurs transcriptionnels ; le domaine d'oligomérisation qui est responsable de l'interaction Stat-protéine et de la formation de tétramères Stat (Xu *et al*, 1996).

Dans des conditions physiologiques, les protéines Stat sont phosphorylées au niveau de leurs résidus tyrosines par des récepteurs à activité tyrosines kinases après leur liaison à des facteurs de croissances ou bien par des tyrosines kinases solubles de la famille Src kinase ou JAK, dans le cas d'activation par des récepteurs cytokines. Les Stat phosphorylées entrent dans le noyau, se lient à l'ADN et y activent la transcription (Tkach *et al*, 2013) (Figure 1.13). Cette voie de signalisation est connue pour son rôle important dans la régulation des processus de la réponse immunitaire. En effet, la voie JAK/STAT est impliquée dans la différenciation et le développement des cellules hématopoïétiques (Pesu *et al*, 2008). La spécificité et l'impact des voies JAK/STAT ne sont pas encore complètement élucidés. Par contre, il a été montré que Jak2 et Src sont responsables de l'activation de Stat3 (Ren et Schaefer, 2002) ainsi la voie de signalisation Jak2/Stat3 joue un rôle crucial dans l'inflammation (Akla *et al*, 2012) et dans les processus impliqués dans différents cancers comme le cancer du poumon (Looyenga *et al*, 2012), le cancer du sein (Tkach *et al*, 2013), le cancer gastrique (Kim *et al*, 2013) et le cancer du foie (Gu *et al*, 2011). Stat3 est impliqué dans les processus biologiques importants dans la tumorigenèse incluant l'angiogenèse tumorale, l'invasion et les métastases, l'évasion des cellules du système immunitaire et la progression du cycle cellulaire (Yu et Jovem 2004). Par exemple, Stat3 est impliquée dans la

dérégulation de l'expression de VEGF, bFGF et MMP-2 ainsi que dans l'angiogenèse tumorale et l'invasion des cellules du mélanome et les métastases dans le cancer du cerveau (Xie *et al*, 2006).

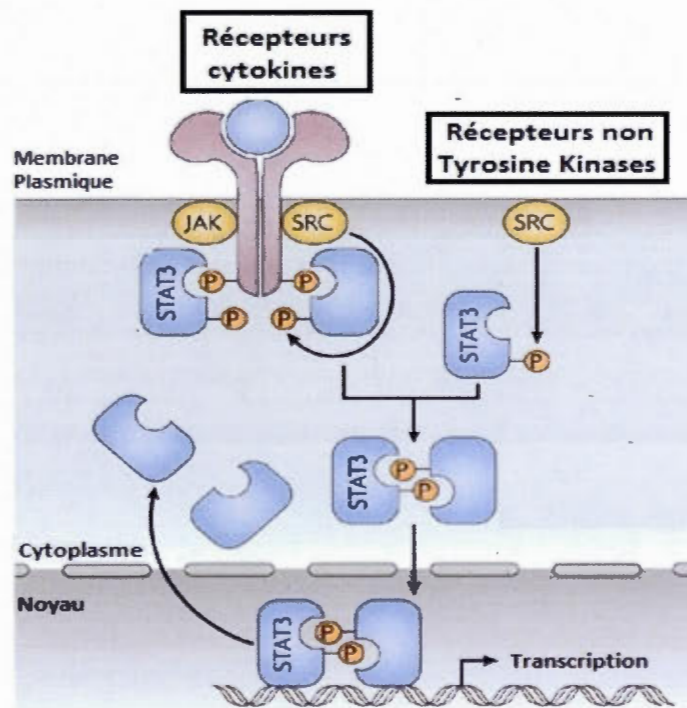


Figure 1.13 Activation de Stat3. La liaison cytokine-récepteur de type I ou II induit le recrutement et la phosphorylation de plusieurs tyrosines kinases comme la famille des JAK et de Src. D'autres types de récepteurs qui ne possèdent pas la fonction tyrosine kinase contribuent à l'activation de Src. Des facteurs de croissance, la phosphorylation de JAK et de Src sont responsables de la phosphorylation de plusieurs protéines de la famille de Stat comme le Stat3. Cette dernière une fois activée entre dans le noyau pour induire la transcription de différents gènes impliqués dans plusieurs processus biologiques dont plusieurs sont sollicités dans la progression tumorale.

[Adapté de Yu *et al*, 2007]

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Les MSC font partie des cellules qui sont recrutées au sein du microenvironnement tumoral et semblent importantes dans la régulation de la progression tumorale. En effet, la migration et l'intégration des MSC dans la tumeur ont été démontrées dans différents modèles précliniques (Dai *et al*, 2011). Ces cellules sont recrutées au site tumoral par des cytokines sécrétées par les cellules cancéreuses pour contribuer aux différents processus tumoraux tels l'angiogenèse, la métastase, l'invasion, la migration et la prolifération cellulaire en se différenciant. Ces processus sont activés par les cellules cancéreuses ou par les cellules recrutées au sein du microenvironnement tumoral suite à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des voies de signalisations impliqués dans les processus induisant la progression tumorale pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de limiter la contribution des MSC à la pathologie néoplasique. Parmi ces stratégies thérapeutiques, l'utilisation d'inhibiteurs tels l'EGCG, une molécule chimiopréventive dérivée de notre alimentation, pourrait cibler des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale.

La MT1-MMP est devenue une cible thérapeutique de choix et fortement étudiée dans la pathologie néoplasique du fait de son implication dans les processus induisant la progression tumorale. En effet, plusieurs études ont montré le rôle que joue la MT1-MMP dans l'angiogenèse tumorale, un processus nécessaire au développement tumoral permettant l'apport continu de l'oxygène et des nutriments au site tumoral par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. De plus, il a été montré que le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP, impliqué dans la régulation de différentes voies de signalisation intracellulaire, est

responsable de l'angiogenèse tumorale en permettant la formation de capillaires et en induisant la migration des cellules endothéliales. Il est donc impératif de comprendre les fonctions attribuables au domaine cytoplasmique de la MT1-MMP permettant d'induire l'angiogenèse tumorale, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.2 Hypothèses de travail

Le rôle de la MT1-MMP, via la signalisation cellulaire induite par son domaine cytoplasmique, dans la régulation de l'angiogenèse tumorale et dans le recrutement des MSC au niveau des foyers tumoraux pourrait contribuer d'un point de vue moléculaire à la vascularisation des tumeurs en régulant l'expression de facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, nous émettons la première hypothèse suivante :

Hypothèse #1 : La MT1-MMP contribue à la régulation des CSF impliquées dans la vascularisation tumorale via la voie de signalisation JAK/Stat dans les MSC.

L'epigallocatechin gallate (EGCG), un polyphénol du thé vert, possède des effets immunomodulateurs et anti-angiogéniques qui lui permettraient d'inhiber l'expression de certains facteurs de croissance ou cytokines sécrétés par des MSC activées. Ainsi, nous émettons la deuxième hypothèse suivante :

Hypothèse #2 : L'EGCG joue un rôle chimio-préventif en inhibant les CSF par le ciblage pharmacologique de la signalisation intracellulaire de la MT1-MMP dans les MSC.

2.3 Objectifs de recherche

Dans un premier temps, nous avons évalué lesquels des membres des CSF sont exprimés et induits dans les MSC activées par la ConA. De plus, nous avons étudié le rôle de MT1-MMP et de la signalisation intracellulaire en aval de la MT1-MMP tel l'axe de signalisation de la famille des Janus Kinases JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 dans la régulation des CSF. Ainsi,

nos objectifs de recherche étaient, dans un deuxième temps, de démontrer lesquels des membres de la famille des JAK sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des CSF. Dans un troisième temps, nous avons souhaité évaluer l'effet d'un traitement avec l'EGCG sur l'expression des CSF sécrétées par des MSC activées par la ConA ou par la surexpression de la MT1-MMP recombinante. Enfin, nous avons étudié dans un quatrième temps le rôle potentiel de Src dans la phosphorylation de la Tyr⁵⁷³ du domaine intracellulaire de la MT1-MMP et, ultimement, son impact dans la régulation transcriptionnelle des CSF.

CHAPITRE III

EPIGALLOCATECHIN-GALLATE TARGETING OF MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE-MEDIATED SRC AND JAK/STAT3 SIGNALLING INHIBITS TRANSCRIPTION OF COLONY STIMULATING FACTORS-2 AND -3 IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Article publié dans la revue scientifique *Journal of Biological Chemistry*

Zgheib A, Lamy S & Annabi B. (2013) Epigallocatechin-gallate targeting of membrane type-1 matrix metalloproteinase-mediated Src and JAK/STAT3 signalling inhibits transcription of colony stimulating factors-2 and -3 in mesenchymal stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 288(19):13378-13386

Contributions des co-auteurs :

Zgheib : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Lamy : Expérimentation, analyse des résultats, rédaction du manuscrit et conception du projet.

Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.

Epigallocatechin-gallate targeting of membrane type-1 matrix metalloproteinase-mediated Src and JAK/STAT3 signalling inhibits transcription of colony stimulating factors-2 and -3 in mesenchymal stromal cells

Alain Zgheib, Sylvie Lamy and Borhane Annabi*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Université du Québec à Montréal

Département de Chimie

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA, H3C 3P8

Phone : 514-987-3000 ext. 7610

Fax : 514-987-0246

E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Colony stimulating factors, Mesenchymal stromal cells, MT1-MMP, EGCG

ABSTRACT

Epigallocatechin gallate (EGCG), a major form of tea catechins, possesses immunomodulatory and antiangiogenic effects which both contribute to its chemopreventive properties. In this study, we evaluated the impact of EGCG treatment on the expression of colony-stimulating factors (CSF) secreted from human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC), all of which also contribute to these cells immunomodulatory and angiogenic properties. MSC were activated with Concanavalin-A (ConA), a Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-6 agonist as well as a membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inducer, which increased granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF, CSF-2), granulocyte CSF (G-CSF, CSF-3), and MT1-MMP gene expression. EGCG antagonized the ConA-induced CSF-2 and CSF-3 gene expression, and this process required an MT1-MMP-mediated sequential activation of the Src and JAK/STAT pathways. Gene silencing of MT1-MMP expression further demonstrated its requirement in the phosphorylation of Src and STAT3, while overexpression of a nonphosphorylatable MT1-MMP mutant (Y573F) abrogated CSF-2 and CSF-3 transcriptional increases. Given that MSC are recruited within vascularizing tumors and are believed to contribute to tumor angiogenesis, possibly through secretion of CSF-2 and CSF-3, our study suggests that diet-derived polyphenols such as EGCG may exert chemopreventive action through pharmacological targeting of the MT1-MMP intracellular signaling.

The abbreviations used are : ConA, concanavalin-A; CSF, colony stimulating factor; ECM, extracellular matrix; EGCG, epigallocatechin gallate; EPC, endothelial progenitor cells; JAK, janus kinase; MSC, mesenchymal stromal cells; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; STAT, signal transducers and activators of transcription; TLR, toll-like receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Increasing evidence supports trophic activities for mesenchymal stromal cells (MSC), which employ their immunomodulatory functions and paracrine contribution towards the formation of vasculature in vivo (Meirelles *et al*, 2009; Sasoli *et al*, 2012). In fact, proangiogenic properties have been documented for MSC isolated from murine tissues, including bone marrow, white adipose tissue, skeletal muscle, and myocardium (Lin *et al*, 2012), while recent advances in our understanding of MSC paracrine contribution to tumour-derived angiogenesis also imply that systemically infused MSC must respond to serum-derived cues that direct their ultimate biodistribution within hypoxic tumours (Annabi *et al*, 2004; Birnbaum *et al*, 2007; Huang *et al*, 2012). The impact of secreted MSC-derived growth factors or cytokines responsible for paracrine regulation of angiogenesis remains, however, not fully understood.

All MSC secrete multiple proangiogenic factors in culture, including members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin families (Mirotsoy *et al*, 2011). More recently, the angiogenic activity of classical hematopoietic cytokines was found to affect certain endothelial cell functions, and hematopoietic factors have been clearly demonstrated to influence angiogenesis (Ribatti, 2012). Furthermore, specific receptors for granulocyte colony-stimulating factor (CSF-2, G-CSF) and for granulocyte macrophage colony-stimulating factor (CSF-3, GM-CSF) have been detected on the surface of endothelial cells (Bussolino *et al*, 1989; Bocchietto *et al*, 1993). Accordingly, subnanomolar concentrations of CSF-2 and of CSF-3 have been shown to induce the proliferation of endothelial cells derived from human vessels (Bussolino *et al*, 1989; Bussolino *et al*, 1991). Currently nothing is known about CSF-2 and CSF-3 expression and transcriptional regulation in MSC.

Recently, we highlighted functional cross-talk between the membrane type-1 MMP (MT1-MMP) and JAK/STAT-mediated signalling in Concanavalin-A (ConA)-activated MSC that could regulate the expression of the inflammation biomarker cyclooxygenase-2 (Akla *et al*, 2012). Interestingly, aside from its canonical role in extracellular matrix (ECM) proteolysis, MT1-MMP is also involved in transducing crucial intracellular signalling that may control

several processes related to MSC mobilisation and cell survival (Annabi *et al*, 2003; Annabi *et al*, 2004; Meriane *et al*, 2006). In this study, we demonstrate that, as a consequence of ConA activation, sequential Src kinase and JAK/STAT3 signalling are required to upregulate CSF-2 and CSF-3 transcription, and that this necessitates the contribution of MT1-MMP transduction through the crucial involvement of a phosphorylable Tyr573 residue located within its 20-amino acid cytoplasmic domain. Finally, we demonstrate that the antiangiogenic, green tea-derived polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) is able to abrogate both ConA- and MT1-MMP-induced CSF-2 and CSF-3 transcription, which effects add-up to EGCG's pleiotropic chemopreventive properties.

MATERIALS AND METHODS

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The JAK family tyrosine kinase inhibitor Tofacitinib (CP-690550) was from Cederlane (Burlington, ON) while AG490 was from Calbiochem (La Jolla, CA). The anti-STAT3 (79D7), anti-phospho-STAT3 (Tyr 705), anti-Src, and anti-phospho-Src polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The polyclonal antibody against the MT1-MMP catalytic domain was from Millipore (Billerica, MA).

Cell cultures : Human MSC, obtained from marrow biopsies of volunteers undergoing hip replacement, were isolated by Ficoll gradient and plastic adherence, and expanded in α MEM (GibcoBRL) with 16.5% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Serum starvation is classically performed by culturing the cells in high α MEM-containing 2 mM L-glutamine and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin from which inactivated fetal bovine serum was omitted. Cell death was quantified using the NucleoCounter device from ChemoMetec (Mandel Scientific Company, Guelph, ON).

Immunoblotting procedures : Cells from MSC were lysed in a buffer containing 1 mM each of NaF and Na_3VO_4 (Meriane *et al*, 2006), and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes and immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence as described previously (Lord-Dufour *et al*, 2009).

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from MSC monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg,

MD). For cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): MT1-MMP (Hs_MMP14_1_SG, QT00001533), β -Actin (Hs_ACTB_2_SG, QT01680476), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), STAT3 (Hs_STAT3_1_SG, QT00068754), CSF-1 (Hs_CSF1_1_SG, QT00035224), CSF-2 (Hs_CSF2_1_SG, QT00000896), CSF-3 (Hs_CSF3_1_SG, QT00001414), TLR-2 (Hs_TLR2_1_SG, QT00236131), TLR-6 (Hs_TLR6_1_SG, QT00216272). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, β -Actin/GAPDH/PPIA RNA, were measured by following a Δ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (Δ CT) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of β -Actin/GAPDH/PPIA RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta\text{CT}}$. Semi-quantitative PCR was performed to examine amplification products and amplicons resolved on 1.8% agarose gels containing 1 μ g/ml ethidium bromide.

Transfection method and RNA interference : MSC were transiently transfected with 20 nM siRNA against SRC (human Hs_src_10 Flexitube siRNA, SI02664151), MT1-MMP (human Hs_MMP14_6 HP siRNA, SI03648841), TLR-2 (human Hs_TLR2_1 Flexitube siRNA, SI00050015), TLR-6 (human Hs_TLR6_2 siRNA, SI00084168) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes. MSC were transiently transfected with cDNA constructs encoding full length MT1-MMP (15) or a non-phosphorylable MT1-MMP mutant Y573F (Nyalendo *et al*, 2008).

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

RESULTS

Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression.

We first assessed whether the TLR-2, TLR-6, CSF-1, CSF-2, and CSF-3 transcripts were present in MSC. Total RNA was extracted from untreated MSC and cDNA was synthesized as described in the Methods section. qPCR was then performed and end of cycle products loaded onto an agarose gel showed that single amplicons with the expected sizes were produced (Fig.1A). When serum-starved MSC were treated with various Concanavalin-A (ConA) concentrations for 18 hours, we found that CSF-1 gene expression was only moderately induced, while those of CSF-2 and CSF-3 were significantly upregulated with CSF-2 reaching a transient peak at 3 $\mu\text{g/ml}$ ConA and CSF-3 reaching a maximal stimulation at 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA (Fig.1B). In agreement we previously reported data (Currie *et al*, 2007), a slight decrease in MSC viability was also monitored at that maximal ConA concentration (Fig.1B, dashed lines). Unless otherwise stated, all subsequent experiments were therefore performed at either 3 $\mu\text{g/ml}$ ConA for CSF-2 or 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for CSF-1 and CSF-3.

TLR-2 and TLR-6 gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation.

Given that MSC express Toll-like receptors (TLR), and that ConA is a TLR-2/6 agonist, we next assessed their respective impact as intermediates in ConA-mediated CSF transcriptional regulation. Efficient TLR-2 and TLR-6 gene silencing was achieved (Fig.2A), and abrogated ConA's ability to trigger CSF-2 and CSF-3 expression (Fig.2B). Our data therefore suggest that either TLR-2 or TLR-6 independently from each other possesses the ability to transduce ConA effects.

EGCG inhibits Concanavalin-A-induced CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression.

Green tea polyphenol EGCG was next tested to evaluate its capacity to alter ConA-induced CSF transcription. MSC were serum-starved and treated with ConA, and then total RNA was isolated. Gene expression levels were assessed by qPCR and we observed that CSF-2 and CSF-3 (Fig.3, left panel), as well as MT1-MMP (Fig.3, right panel), were strongly downregulated by EGCG with calculated IC_{50} ranging from 1.9-2.3 μM for CSF-2 and CSF-3. Moderate decreases in CSF-1 (~42%) and in STAT3 (~21%) gene expressions were

observed in ConA-treated cells. EGCG alone up to 30 μ M did not affect MSC viability, while a slight 5-8% additional effect was found to decrease cell viability in the presence of ConA (not shown).

Concanavalin-A-induced sequential phosphorylation of Src and STAT3 is inhibited by EGCG. Given that ConA is a TLR-2/6 agonist, we next sought to evaluate the Src and JAK/STAT3 signalling pathways. MSC were serum-starved and treated with ConA, and then cell lysates were isolated for Western blotting and immunodetection. We found that Src phosphorylation was rapidly and transiently induced within the first minute of treatment (Fig.4A), while STAT3 phosphorylation only peaked at 2 hours of treatment (Fig.4B). When MSC were preincubated with EGCG in order to compare its effects with pharmacological inhibitors of Src (PP2) or Jak (AG490, Tofacitinib), we found that EGCG effectively inhibited short-term Src phosphorylation (Fig.4C, right panel), as well as long-term STAT3 phosphorylation (Fig.4D, right panel). Short-term phosphorylation of Src by ConA was not affected by AG490 or Tofacitinib (Fig.4C, left panel), while that of STAT3 was inhibited by PP2 preincubation (Fig.4D, left panel) suggesting that a sequential signalling cascade occurs following ConA stimulation.

MT1-MMP and Src are respectively required for Src and STAT3 phosphorylation by Concanavalin-A. Given that MT1-MMP was recently shown to regulate STAT3 phosphorylation (Akla *et al*, 2012), and that this also requires Src kinase activity, we decided to assess the potential relationship between MT1-MMP-mediated signalling and Src kinase activity in ConA action. Src (Fig.5A) and MT1-MMP (Fig.5B) protein expression in MSC were significantly silenced using specific siRNA strategies. When MSC were then treated with ConA, both Src phosphorylation (Fig.5A, 1 min treatment) and STAT3 phosphorylation (Fig.5B, 2 hrs treatment) were abrogated. This suggests that ConA-mediated phosphorylation of Src and of STAT3 requires an initial signaling cascade triggered by MT1-MMP.

MT1-MMP and Src kinase activity are required in Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcription. A gene silencing strategy similar to that above was applied to assess whether ConA required either MT1-MMP or Src to trigger CSF gene expression. We found that MT1-

MMP and Src gene silencing abrogated ConA-induced CSF-2 and CSF-3, but not CSF-1, transcription (Fig.6). Interestingly, PP2 antagonized ConA-induced CSF-2 and CSF-3 confirming the requirement for Src kinase activity.

MT1-MMP overexpression triggers Src and STAT3 phosphorylation which leads to CSF-2 and CSF-3 increased transcription. In order to better ascertain the importance of intracellular signalling originating from the cytoplasmic domain of MT1-MMP, recombinant forms of either Wt-MT1-MMP or a mutant MT1-MMP, in which the crucial Tyr⁵⁷³ residue was mutated (Y73F), were overexpressed in MSC. Both recombinant forms were efficiently overexpressed (Fig.7A and 7B). Only the Wt-MT1-MMP signalled Src and STAT3 phosphorylation (Fig.7A) and led to increased transcription of both the CSF-2 and CSF-3 genes (Fig.7C). Mutation of Tyr⁵⁷³ within the MT1-MMP cytoplasmic domain prevented it from triggering Src or STAT3 phosphorylation or increasing the extent of CSF-2 and CSF-3 transcription. This demonstrates that increased MT1-MMP expression signals CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation.

EGCG inhibits MT1-MMP-mediated Src and STAT3 phosphorylation. In light of its ability to inhibit ConA-mediated Src and STAT3 phosphorylation and given the fact that MT1-MMP silencing abrogated ConA's action, we next assessed EGCG's ability to target MT1-MMP-mediated signaling functions. MT1-MMP was overexpressed in MSC, and then cells were subjected to 30 μ M EGCG treatment. We found that EGCG effectively diminished Wt-MT1-MMP-mediated Src and STAT3 phosphorylation (Fig.8A) and caused decreased CSF-2 and CSF-3 transcription (Fig.8B), as was similarly observed in ConA-treated cells.

DISCUSSION

Since its discovery, MT1-MMP has been extensively investigated and is now among the best characterized MMPs. MT1-MMP has been implicated in various physiological and pathological processes such as wound healing, bone development, angiogenesis, inflammation, cancer invasion and metastasis (Bauvois, 2004), all of which also involve the recruitment of circulating bone marrow-derived MSC (Abarrategi *et al*, 2011). Although MT1-MMP primarily functions immediately outside the cell surface, where it modifies the environment of the cell (Moss *et al*, 2009), it is now suggested that alteration of signalling driven from the ECM adhesion molecules or in response to chemokines can be transduced by MT1-MMP, thereby influencing cellular functions (Gonzalo *et al*, 2010). In our study, we demonstrate the essential requirement for MT1-MMP in transducing intracellular signalling that regulates CSF-2 and CSF-3 transcription. Given its capacity to interact with extracellular components that impact on intracellular functions, a plausible mechanism may, upon extracellular complexation of MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP, trigger a potential conformational change in MT1-MMP structure that would impact on its ability to relay intracellular signals. To validate such an audacious hypothesis, one would need a complex structure-to-function study with MT1-MMP deletion mutants within its catalytic, hemopexin, and hinge domains all believed to recognize, anchor, and catalyze proMMP to MMP activation.

MT1-MMP's intracellular function was also reported to impact on transcriptional regulation of other tumourigenic growth factors, such as VEGF-A (Eisenach *et al*, 2010). In fact, among the numerous circulating chemotactic mediators, chemokines play key roles in haematopoietic stem cell trafficking (Bautz *et al*, 2001), and in endothelial progenitor cells (EPC) homing to tumours. As such, high levels of serum VEGF and CSF were correlated to EPC recruitment within tumour microvessels where they were found to contribute to tumour vasculogenesis (Sun *et al*, 2012). Furthermore, our findings that CSF-3 is induced through MT1-MMP signaling in MSC add to its list of key roles in myeloid cell recruitment since it affects vasculogenesis through recruitment of EPC (Yoshioka *et al*, 2006). These studies, along with the fact that CSF-3 accelerates re-endothelialisation processes after vascular injury

(Yoshioka *et al*, 2006), suggest that CSF-3 plays several roles not only through effects on neutrophils but also through effects on other bone marrow-derived cells.

Our current study also sheds light on the emerging importance of TLR modulators such as the naturally-occurring plant lectins. These lectins are used by the pharmaceutical industry as part of reliable *in vitro* cell functional assays for studying biological systems ranging from mitogenicity to pro-inflammatory cytokine production (Kanellopoulos *et al*, 1985; Ferriz-Martinez *et al*, 2010). Given the use of the lectin ConA, a potent TLR-2 and TLR-6 agonist, in MSC activation, our study further supports the known crosstalk that exists between TLR and cancer (Goutagny *et al*, 2012), angiogenesis (Grote *et al*, 2011) and inflammation (Kong & Le, 2011). Interestingly, ConA is well documented as inducing MT1-MMP, the expression of which has also been documented in all the above regulated processes, similar to TLR involvement (Arroyo *et al*, 2007; Strongin, 2010). Our study shows that EGCG inhibits both ConA- and MT1-MMP-mediated signalling that leads to increased CSF-2 and CSF-3 gene expression. In support of this, EGCG was already described as inhibiting TLR-2 and TLR-4 signaling (Byun *et al*, 2011; Byun *et al*, 2012), as well as the signaling that leads to diminished MT1-MMP gene expression (Annabi *et al*, 2002). We further show that EGCG inhibits a ConA- and MT1-MMP-mediated signaling cascade that leads to Src and STAT3 phosphorylation (Fig.9). Such Src phosphorylation was previously reported in MCF-7 breast cancer cells where it regulated the transcription of VEGF-A (Eisenach *et al*, 2010). Besides its impact on cancer progression and angiogenesis, MT1-MMP-mediated transcriptional regulation of genes seems to also be among the functions that impact on the expression of biomarkers in autophagy (Pratt *et al*, 2012) as well as in neuroinflammation (Annabi *et al*, 2009).

In the current study, we also confirmed a role for the Tyr⁵⁷³ residue located within the intracellular domain of MT1-MMP since the Y573F mutation disabled MT1-MMP's capacity to trigger Src phosphorylation and subsequent CSF-2 and CSF-3 transcription. Interestingly, MT1-MMP-mediated phosphorylation of Src is also believed to trigger a positive feedback loop resulting in increased MT1-MMP phosphorylation which may also regulate MT1-MMP ubiquitination at Lys⁵⁸¹ and lead to increased cell migration (Eisenach *et al*, 2012). Src-

mediated phosphorylation was, in fact, shown to occur within the Tyr⁵⁷³ of the intracellular domain of MT1-MMP where it was suggested to affect endothelial cell migration (Nyalendo *et al*, 2007). Impaired phosphorylation of Tyr⁵⁷³ was shown to reduce tumour growth in mice (Currie *et al*, 2007), but further transcription studies were not performed. In our study, we demonstrate that impaired Tyr⁵⁷³ phosphorylation abrogates MT1-MMP's ability to regulate CSF-2 and CSF-3 gene transcription which may, in part, explain the previously reported low tumour-associated angiogenesis.

Given previous moderate-to-no success targeting of soluble secreted MMPs, membrane-bound MMPs have recently become critical pharmacological targets in angiogenesis-related disease treatment (Arroyo *et al*, 2007). Accordingly, preclinical proof of principle rationale was recently provided for the design and development of novel and selective MT1-MMP inhibitors that specifically target its hemopexin domain (Remacle *et al*, 2012), while recent molecular profiling has identified Actinonin, originally classified as an aminopeptidase N/CD13 pharmacological inhibitor, with MT1-MMP targeting functions (Sina *et al*, 2009). Finally, impact on lymphangiogenesis with selective targeting of MT1-MMP was also achieved through the use of specific monoclonal antibodies (Ingvarsen *et al*, 2013), while AG3340 a potent small-molecule MT1-MMP antagonist was required for the design of novel therapies for type 1 diabetes (Savinov & Strongin, 2013).

In conclusion, primary vascularizing and metastatic tumors are thought to attract MSC in their microenvironment where they become tumour-associated fibroblasts, affect tumor cell survival and angiogenesis, and have an immunomodulatory function (Annabi *et al*, 2004; Bergfeld & Declerck, 2010). Provided that those IC₅₀ values of EGCG we report in this study (Fig.3) closely approximate the reported plasmatic concentrations of ~1 µM (Yang *et al*, 1998; Umegaki *et al*, 2001), with optimal pharmacological effects achieved at 30 µM, our study puts emphasis on potential strategies aimed at targeting MSC proangiogenic and immunomodulatory functions, thereby preventing their contribution to tumour development. Given that MSC contribute to tumour angiogenesis, possibly through secretion of CSF-2 and CSF-3, we provide the first molecular evidence that one such strategy makes use of the

chemopreventive properties of diet-derived polyphenols such as EGCG that may act through pharmacological targeting of the MT1-MMP intracellular signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This study was funded by the “Chaire de Recherche en Prévention et Traitement du Cancer” and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

FIGURES

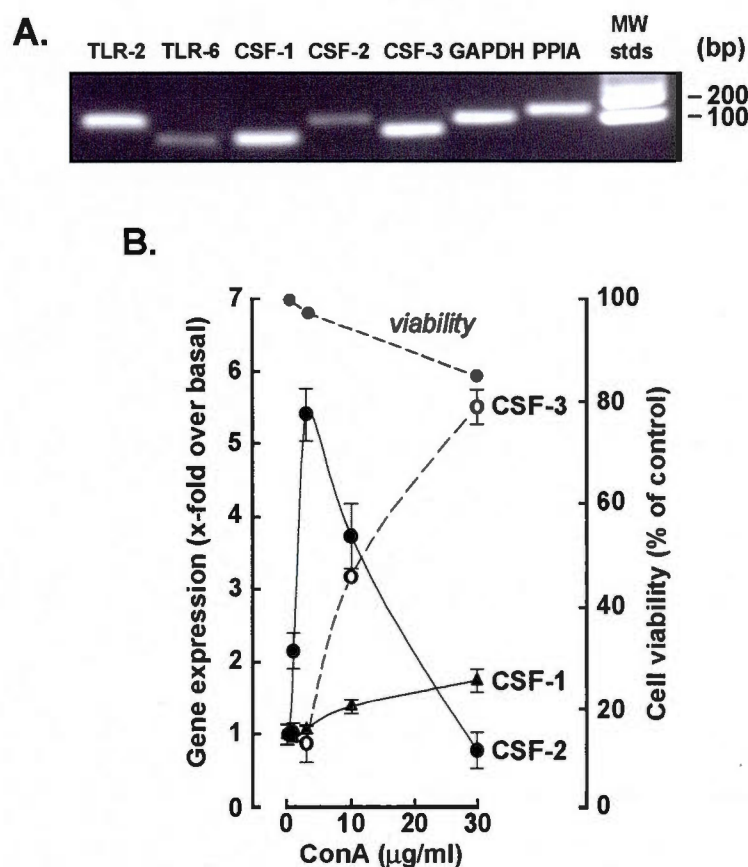


Fig.1 : Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with various concentrations of Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess gene expression. (A) A representative agarose gel of the corresponding single product amplicons is shown. (B) A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for TLR-2, TLR-6, CSF-1, CSF-2, and CFS-3 genes. Data represent mean values from triplicates. Typical cell viability readout was assessed as described in the Methods section and is represented by dashed lines.

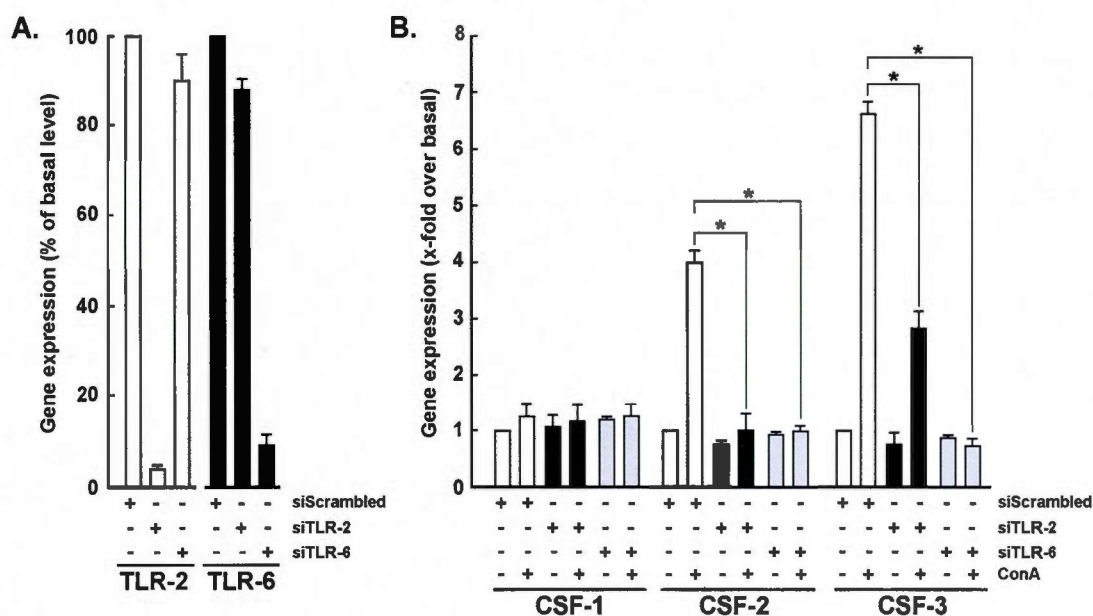


Fig.2 : TLR-2 and TLR-6 gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScrambled), TLR-2 siRNA (siTLR-2), or TLR-6 siRNA (siTLR-6) as described in the Methods section. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess (A) TLR-2 and TLR-6 gene silencing, as well as (B) CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression upon treatment with 3 μ g/ml (CSF-2) or 30 μ g/ml (CSF-1, CSF-3) of Concanavalin-A (ConA) for 24 hours.

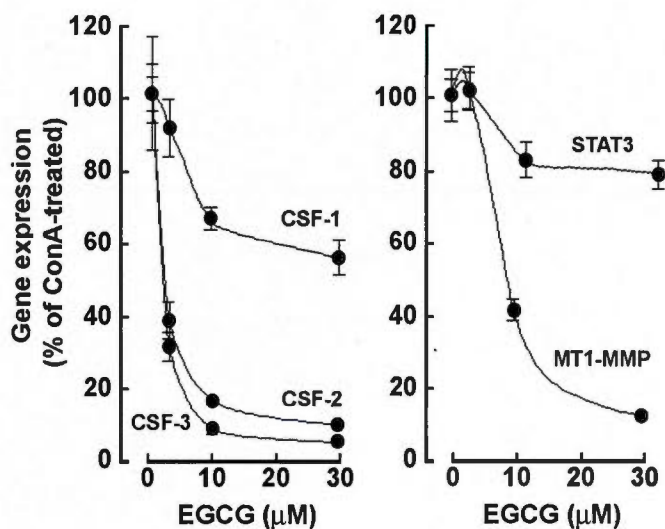


Fig.3 : EGCG inhibits Concanavalin-A-induced CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with Concanavalin-A (ConA) at either 3 $\mu\text{g/ml}$ (CSF-2) or 30 $\mu\text{g/ml}$ (CSF-1, CSF-3) for 24 hours in the presence of increasing concentrations of EGCG (vehicle is 70% EtOH). Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess gene expression of (A) CSF-1, CSF-2, CSF-3, and (B) MT1-MMP, STAT3. A representative qPCR profile, from three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates.

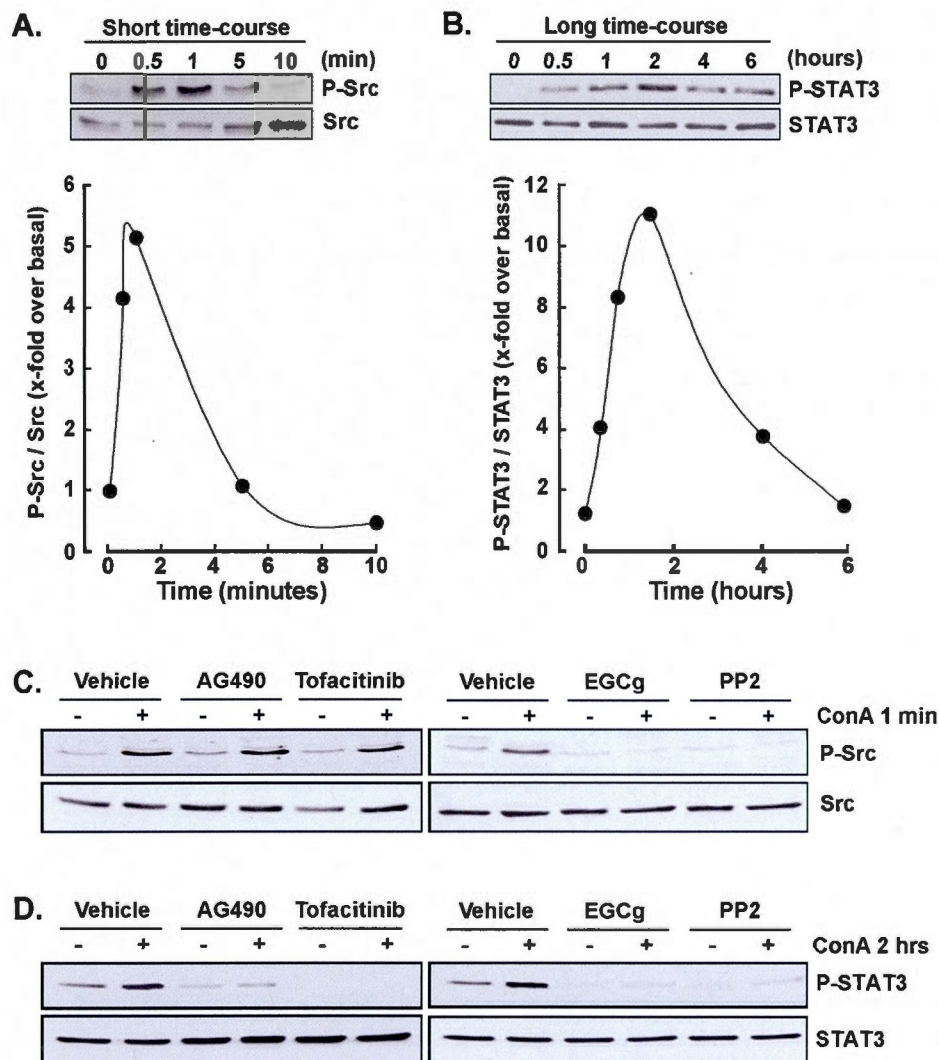


Fig.4 : EGCG inhibits Concanavalin-A-induced short-term Src phosphorylation and long-term STAT3 phosphorylation. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with 30 μ g/ml Concanavalin-A for the times indicated. Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection were performed using (A) anti-phospho-Src and anti-Src, or (B) with anti-STAT3 and anti-phospho-STAT3 antibodies. A representative scanning densitometry assessment was performed to show the respective extent of Src phosphorylation and of STAT3 phosphorylation. Pre-incubation of MSC for 30 minutes was performed with vehicle, 30 μ M AG490, 30 μ M Tofacitinib, 30 μ M EGCG, or 10 μ M PP2, followed by a treatment with 30 μ g/ml Concanavalin-A for (C) 1 minute, or (D) 2 hours. Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection were performed using the indicated antibodies. Vehicle for AG490 and Tofacitinib was H₂O. Vehicle for EGCG and PP2 was 70% EtOH.

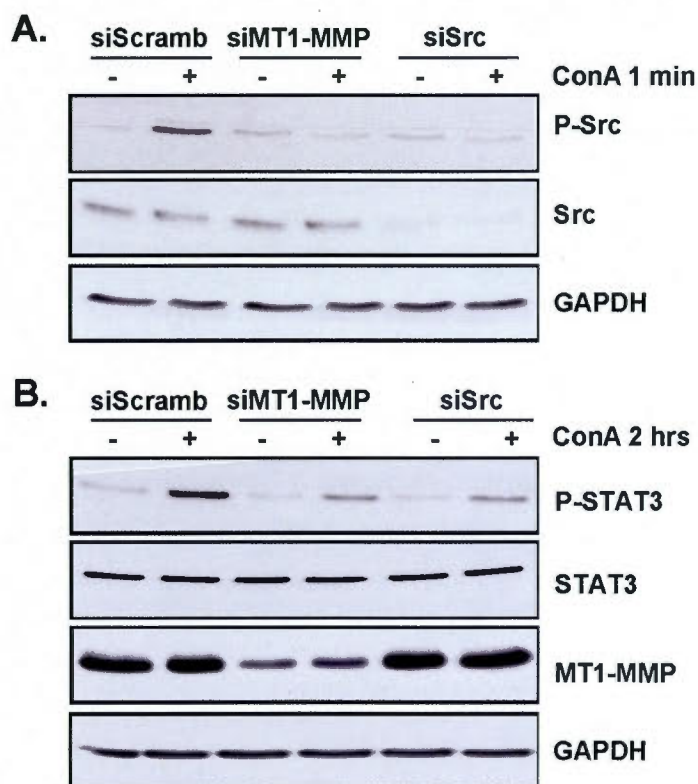


Fig.5 : MT1-MMP and Src gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced Src and STAT3 phosphorylation. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScramb), Src siRNA (siSrc), or MT1-MMP siRNA (siMT1-MMP) as described in the Methods section. MSC were then serum-starved and treated with 30 μ g/ml Concanavalin-A for either (A) 1 minute to monitor Src phosphorylation, or (B) 2 hours to monitor STAT3 phosphorylation. Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection were performed using (A) anti-phospho-Src and anti-Src, or (B) with anti-STAT3, anti-phospho-STAT3 antibodies.

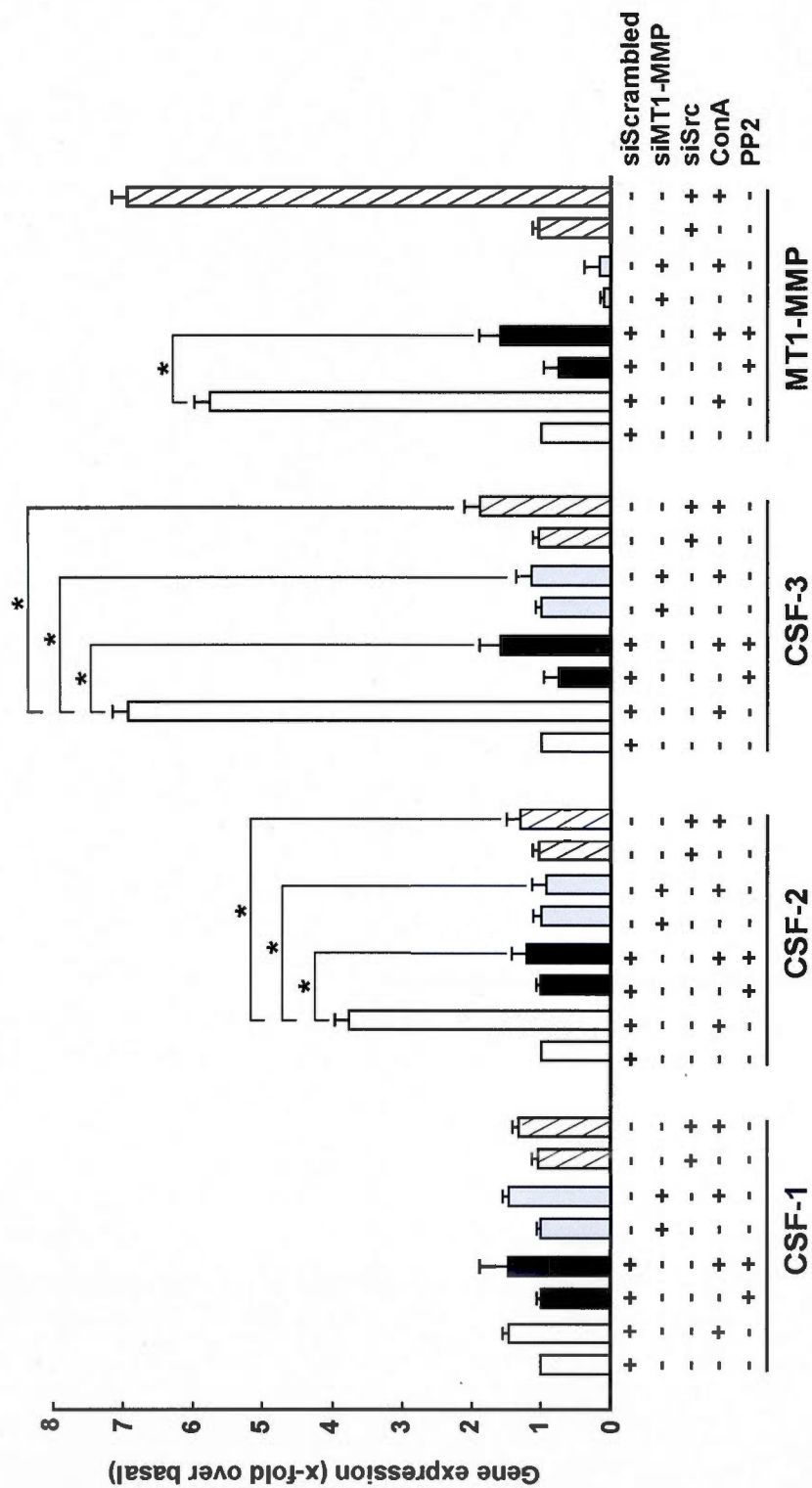
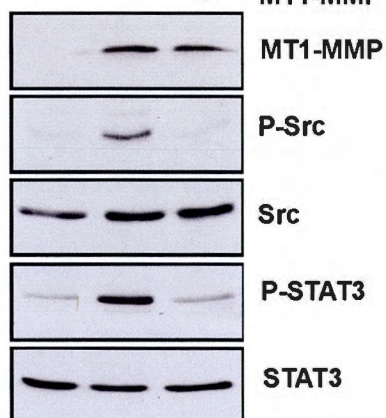


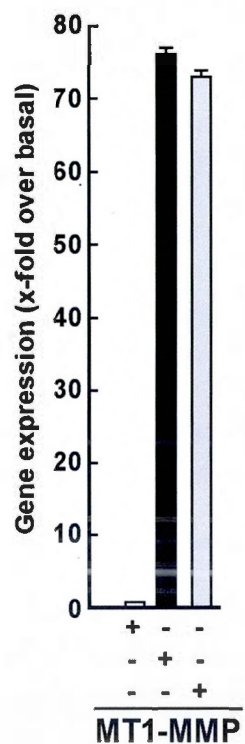
Fig.6 : MT1-MMP and Src gene silencing abrogates Concanavalin-A-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScrambled), Src siRNA (siSrc), or MT1-MMP siRNA (siMT1) as described in the Methods section. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess CSF-1, CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression upon treatment with 3 μ g/ml (CSF-2) or 30 μ g/ml (CSF-1, CSF-3) of Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. Where indicated, cells were pretreated for 30 minutes with 10 μ M PP2 prior to Concanavalin-A treatment.

A.

+	-	-	Mock
-	+	-	MT1-MMP Wt
-	-	+	MT1-MMP Y573F



B.



C.

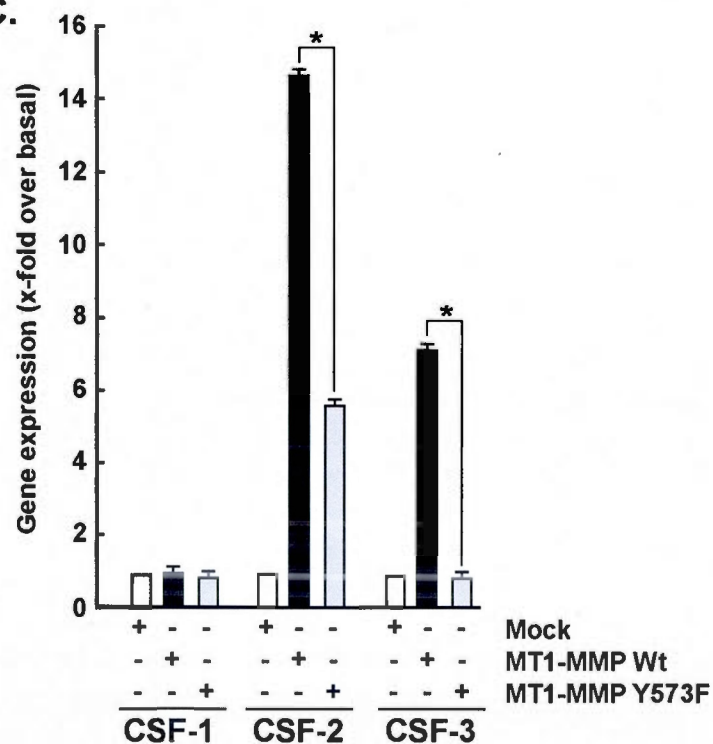


Fig.7 : MT1-MMP overexpression triggers CSF-2 and CSF-3 gene expression and requires phosphorylation of Tyr⁵⁷³ in its intracellular domain. Subconfluent MSC were transiently transfected with cDNA plasmids encoding Wt full-length MT1-MMP or MT1-MMP mutant Y573F, as described in the Methods section. Cell lysates were isolated, and western blotting and immunodetection performed using (A) anti-phospho-Src, anti-Src, anti-STAT3, anti-phospho-STAT3, or anti-MT1-MMP antibodies. (B) Total RNA was also extracted from the lysates and qRT-PCR was used to assess gene expression of MT1-MMP, or (C) CSF-1, CSF-2, and CSF-3. A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates.

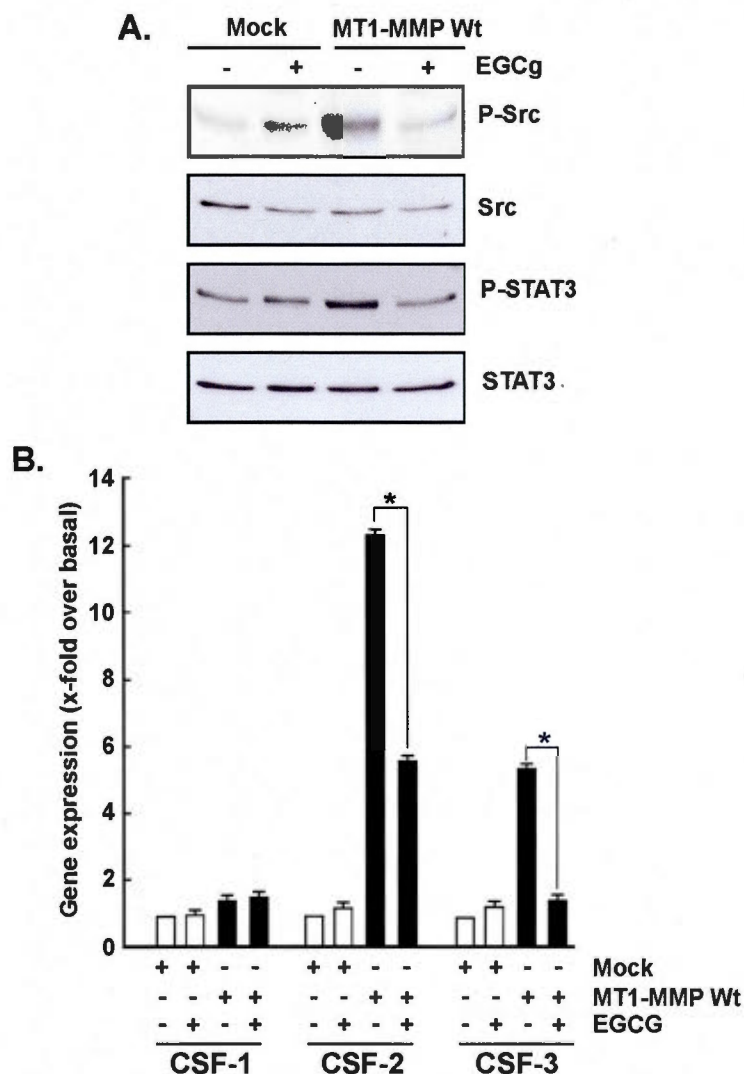


Fig.8 : EGCG inhibits MT1-MMP-induced Src and STAT3 phosphorylation, and inhibits CSF-2 and CSF-3 gene expression. Subconfluent MSC were transiently transfected with a cDNA plasmid encoding the Wt full-length MT1-MMP as described in the Methods section. Cells were then treated with 30 μ M EGCG for 18 hours, lysates were isolated, and western blotting and immunodetection performed using (A) anti-phospho-Src, anti-Src, anti-STAT3, or anti-phospho-STAT3. (B) Total RNA was extracted from the lysates and qRT-PCR was used to assess gene expression of CSF-1, CSF-2, and CSF-3. A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates.

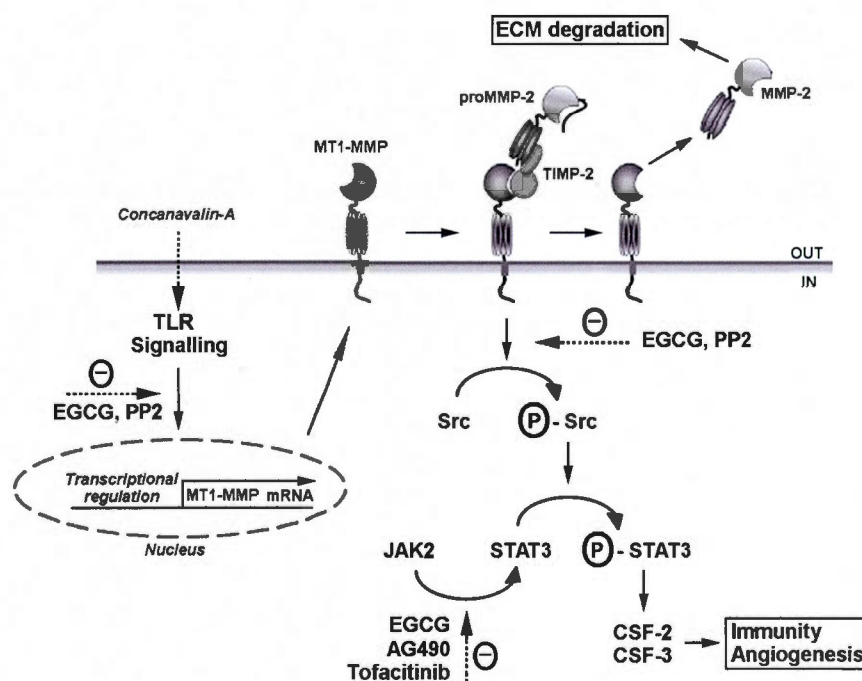


Fig.9 : **Scheme summarizing the effects of EGCG against the molecular mechanisms involved in Concanavalin-A- and MT1-MMP-mediated regulation of CSF-2 and CSF-3 transcription.** In this study, we show that ConA triggers MT1-MMP, CSF-2, and CSF-3 transcription, possibly through Toll-like receptor (TLR)-mediated signalling. Increased MT1-MMP gene/protein expression triggers sequential Src and STAT3 phosphorylation, which require the involvement of a crucial phosphorylable Tyr⁵⁷³ located within the MT1-MMP intracellular domain. Pharmacological inhibitors of the Src kinase (PP2) and JAK/STAT pathways (AG490, Tofacitinib), as well as the green tea-derived EGCG, efficiently inhibit both ConA- and MT1-MMP-dependent signalling. TIMP-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2.

CHAPITRE IV

SELECTIVE JAK/STAT3 SIGNALLING REGULATES COLONY STIMULATING FACTOR-2 AND -3 TRANSCRIPTION IN CONCAVALIN-A-ACTIVATED MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Article publié dans la revue scientifique *CYTOKINE*

Zgheib A, Pelletier-Bonnier E, Levros Jr LC & Annabi B. (2013) Selective JAK/STAT3 signalling regulates colony stimulating factor-2 and -3 transcription in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells. *Cytokine*. 63(2):87-93.

Contributions des co-auteurs :

Zgheib : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Pelletier-Bonnier : Expérimentation et essais biologiques.

Levros Jr : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, rédaction du manuscrit.

Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.

**Selective JAK/STAT3 signalling regulates transcription of colony stimulating factor-2
and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells**

Alain Zgheib, Émilie Pelletier-Bonnier, Louis-Charles Levros Jr. and Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de
Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

Correspondence should be directed to :

Borhane Annabi, PhD, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514)
987-3000 ext 7610; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Mesenchymal stromal cells, G-CSF, GM-CSF, STAT3, MT1-MMP, JAK,
angiogenesis

ABSTRACT

Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) express Toll-like receptors (TLR) and produce cytokines and chemokines, all of which contribute to these cells' immunomodulatory and proangiogenic properties. Among the secreted cytokines, colony-stimulating factors (CSF) regulate angiogenesis through activation of endothelial cell proliferation and migration. Since MSC are recruited within hypoxic tumors where they signal paracrine-regulated angiogenesis, the aim of this study was to evaluate which CSF members are expressed and are inducible in activated MSC. Furthermore, we investigated the JAK/STAT signal transducing pathway that may impact on CSF transcription. MSC were activated with Concanavalin-A (ConA), a TLR-2/6 agonist as well as a membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inducer, and we found increased transcription of granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF, CSF-2), granulocyte CSF (G-CSF, CSF-3), and MT1-MMP. Gene silencing of either STAT3 or MT1-MMP prevented ConA-induced phosphorylation of STAT3, and reversed ConA effects on CSF-2 and CSF-3. Treatment with the Janus Kinase (JAK)2 inhibitor AG490 antagonized the ConA induction of MT1-MMP and CSF-2, while the pan-JAK inhibitor Tofacitinib reversed ConA-induced CSF-2 and -3 gene expression. Silencing of JAK2 prevented the ConA-mediated increase of CSF-2, while silencing of JAK1, JAK3 and TYK2 prevented the increase in CSF-3. Given that combined TLR-activation and locally-produced CSF-2 and CSF-3 could regulate immunomodulation and neovascularization, pharmacological targeting of TLR-2/6-induced MT1-MMP/JAK/STAT3 signalling pathway may prevent MSC contribution to tumor development.

Abbreviations : ConA, concanavalin-A; CSF, colony stimulating factor; ECM, extracellular matrix; JAK, janus kinase; MSC, mesenchymal stromal cells; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; STAT, signal transducers and activators of transcription; TLR, Toll-like receptors

1. INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSC) ability to suppress the immune system is, in part, attributed to Toll-like receptors (TLR) activation and signalling (Auletta *et al*, 2012). In fact, TLR ligation has been reported to influence MSC differentiation, proliferation, migration, and immunomodulation (Bunnell *et al* 2010; DelaRosa *et al*, 2010). Among the emerging important TLR modulators, naturally-occurring plant lectins are used by the pharmaceutical industry for reliable *in vitro* cell functional assays to study biological systems ranging from mitogenicity to pro-inflammatory cytokine production (Kanellopoulos *et al*, 1985; Ferriz-Martinez *et al*, 2010). To this end, the lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA) is commonly used to stimulate TLR2/6 (Unitt & Hornigold, 2011) signalling, and has helped unravel several MSC angiogenic (Annabi *et al*, 2003), proliferative (Fortier *et al*, 2008) and immunosuppressive/immunomodulatory functions (Scheibe *et al*, 2012), as well as their possible use in tissue engineering and cell therapy (Nishimura *et al*, 2004). More recently, ConA was found to trigger inflammatory responses through JAK/STAT3 signalling in MSC (Akla *et al*, 2012). Thus the first aim of this study was to specifically assess CSF gene expression levels and the contribution of the JAK/STAT signalling pathway that may regulate CSF transcription in ConA-activated MSC.

Recruitment of MSC by experimental implanted vascularizing tumors and their incorporation within the tumor architecture (Studený *et al*, 2002; Nakamizo *et al*, 2005) implies that these cells must ultimately respond to inflammation- and tumor-derived growth factor cues (Annabi *et al*, 2004; Birnbaum *et al*, 2007). Given their intrinsic immunosuppressive property (Le Blanc & Ringdén, 2005; Dazzi *et al*, 2012), it is further hypothesized that MSC could contribute to tumor formation and growth *in vivo* through some paracrine-mediated processes involving, in part, promotion of neovascularization (Huang *et al*, 2012). In fact, MSC's contribution to pathological angiogenesis, such as that involved in solid tumor development, has been demonstrated to occur through their integration into tumor vessel walls as pericytes-like MSC (Bexell *et al*, 2009). On the other hand MSC were also shown to promote physiological angiogenesis in therapeutic approaches (Al-Khaldi *et al*, 2003; Chen *et al*,

2006). Several mechanisms by which MSC contribute to angiogenesis are currently explained by their significant paracrine effects rather than their differentiation capacity (Wong, 2011). For example, MSC demonstrate trophic effects via the production of various growth factors and cytokines (Caplan & Dennis, 2006). These include an assortment of hematopoietic cytokines including constitutively expressed macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, CSF-1), stem cell factor, interleukin-6, interleukin-11, inducible expressed granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, CSF-3) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, CSF-2) (Majumdar *et al*, 2000). Interestingly, both CSF-2 and CSF-3 induce endothelial cells to trigger an activation/differentiation program related to angiogenesis (Bussolino *et al*, 1991).

ConA treatment further elicits biological lectin/carbohydrate interactions known to mediate extracellular matrix (ECM) protein recognition in part through MT1-MMP, a cell surface matrix metalloproteinase also demonstrated to drive MSC mobilization (Annabi *et al*, 2003; Karow *et al*, 2009), and to trigger crucial signal transducing functions, which included interactions with intracellular p130Cas (Gingras *et al*, 2008), MTCBP-1 (Uekita *et al*, 2004), 3BP2 (Proulx-Bonneau *et al*, 2011), and Src-mediated events (Nyalendo *et al*, 2007). In order to assess the potential triggering events involved in ConA-mediated CSF transcriptional regulation, we also evaluated alternate downstream signalling targets of MT1-MMP such as the Janus Kinase family JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 signalling axis in CSF transcriptional regulation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Materials*

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The JAK family tyrosine kinase inhibitors Tofacitinib (CP-690550) were from Cederlane (Burlington, ON) and AG490 from Calbiochem (La Jolla, CA). The anti-STAT3 (79D7) and anti-phospho-STAT3 (Tyr 705) polyclonal antibodies were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). The polyclonal antibody against the MT1-MMP catalytic domain was from Millipore (Billerica, MA).

2.2. *Cell cultures*

Human MSC were obtained from marrow biopsies of volunteers undergoing hip replacement and isolated by Ficoll gradient. Cells were plated in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin. After 5-7 days of incubation in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂, the nonadherent hematopoietic cells were discarded. Adherent MSC were further grown on non-coated culture dishes and maintained over 14 passages. Analysis by flow cytometry performed at passage 14 revealed that MSC expressed CD44, yet were negative for CD45, CD31, KDR/flk1 (VEGF-R2), flt-4 (VEGF-R3), and Tie2 (angiopoietin receptor) (data not shown). Serum starvation was performed by culturing the cells in high α MEM, 2 mM L-glutamine, and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin from which the inactivated fetal bovine serum was omitted.

2.3. *Immunoblotting procedures*

Cells from MSC were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to

polyvinylidene difluoride membranes and immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence as described previously (Lord-Dufour *et al*, 2009).

2.4. Gelatin zymography

Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels of secreted proMMP-2 and MMP-2 activities. Briefly, an aliquot (20 μ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich Canada, G2625). The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 (Bioshop, TRX506.500) and rinsed in nanopure distilled water. Gels were further incubated at 37°C for 20 h in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 and then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 (Bioshop, CBB250) and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in water. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

2.5. Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from MSC monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): MT1-MMP (Hs_MMP14_1_SG, QT00001533), β -Actin (Hs_ACTB_2_SG, QT01680476), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), STAT3 (Hs_STAT3_1_SG, QT00068754), CSF-1 (Hs_CSF1_1_SG, QT00035224), CSF-2 (Hs_CSF2_1_SG, QT00000896), CSF-3 (Hs_CSF3_1_SG, QT00001414). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, β -Actin/GAPDH/PPIA RNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of β -Actin/GAPDH/PPIA RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and

the relative quantified value (RQV) was expressed as 2^{-C_T} . Semi-quantitative PCR was performed to examine amplification products and amplicons resolved on 1.8% agarose gels containing 1 μ g/ml ethidium bromide.

2.6. *Transfection method and RNA interference*

Subconfluent (30-50%) MSC were transiently transfected for 24 hours in serum-free media and with 20 nM siRNA against STAT3 (human Hs_STAT3_7 FlexiTube siRNA, SI02662338), MT1-MMP (human Hs_MMP14_6 HP siRNA, SI03648841), JAK1 (human Hs_JAK1_5 FlexiTube siRNA, SI00605514), JAK2 (human Hs_JAK2_7 FlexiTube siRNA, SI02659657), JAK3 (human Hs_JAK3_5 FlexiTube siRNA, SI00604800), TYK2 (HS_TYK2_5 FlexiTube siRNA, SI02223221), or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

2.7. *Statistical data analysis*

Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

3. RESULTS

3.1. *Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression.*

We first assessed whether each of the CSF-1, CSF-2, and CSF-3 transcripts were present in MSC. Total RNA was extracted from untreated MSC and cDNA was reversed transcribed as described in the Methods section. qPCR was then performed and end of cycle products were loaded onto an agarose gel to demonstrate that a single amplicon with the expected size was produced (Fig.1A). When serum-starved MSC were treated with various ConA concentrations for 18 hours, we found that CSF-1 gene expression was only moderately induced, while that of CSF-2 and CSF-3 were significantly upregulated, with CSF-2 reaching a peak at 3 μ M ConA and CSF-3 reaching maximal stimulation at 30 μ M ConA (Fig.1B). Given that ConA is a well-documented inducer of MT1-MMP, we also observed a dose-dependent increase in MT1-MMP gene expression as expected, while that of STAT3 remained unaffected (Fig.1B).

3.2. *MT1-MMP and STAT3 gene silencing abrogates ConA-induced CSF-2 and CSF-3 transcriptional regulation.*

As MT1-MMP is well known to be induced by ConA and to transduce intracellular-mediated signalling in processes such as invasion (Nyalendo *et al*, 2008), inflammation (Sina *et al*, 2010) and autophagy (Pratt *et al*, 2012), and since STAT3 is believed to partly regulate CSF transcription (Cuiffo & Karnoub, 2012), we used gene silencing strategies to evaluate their effects in ConA-treated cells. MSC were transiently transfected with siRNA against STAT3 (siSTA), or MT1-MMP (siMT1), or with a scrambled sequence (siScr), and then treated with ConA. STAT3 and MT1-MMP gene silencing were very specific and effective (Fig.2A, STAT3 black bars, MT1-MMP grey bars). We found that diminishing either STAT3 or MT1-MMP expression prevented ConA from inducing CSF-2 and CSF-3 gene expression without affecting the marginal increase in CSF-1 (Fig.2A). STAT3 gene silencing did not reverse MT1-MMP-dependent proMMP-2 activation, as shown by the zymogram of the conditioned media (Fig.2B). Collectively, this suggests that potential STAT3 transcription factor binding sites may be crucial within the CSF promoter regions and may regulate their transcription.

3.3. *Pharmacological inhibition of JAK family members selectively antagonizes ConA-mediated increases of MT1-MMP, CSF-1, -2, and -3.*

We recently reported a JAK/STAT3 signalling axis in ConA-treated MSC. We therefore assessed whether treatment with the pan-JAK inhibitor Tofacitinib or with the JAK2 inhibitor AG490 could affect ConA-mediated CSF transcriptional regulation. We found that neither ConA-induced CSF-1 nor ConA-induced CSF-3 gene expression were affected by AG490 (Fig.3A, black bars); only ConA-induced CSF-2 and ConA-induced MT1-MMP gene expression were inhibited. When Tofacitinib was used, diminished ConA induction of CSF-2 and CSF-3 were observed (Fig.3A, grey bars). These results suggest that a potential JAK2/STAT signalling axis regulates ConA-mediated transcription of CSF-2 and MT1-MMP, and that alternate JAK signalling is required for CSF-2 and CSF-3 gene expression. In order to validate functional inhibition by AG490 and Tofacitinib, monitoring of the STAT3 phosphorylation state was then performed by immunoblotting. Optimal STAT3 phosphorylation has already been reported to occur after 1-2 hours treatment [11]. We observed that treatment with the JAK2 inhibitor AG490 or gene silencing of either MT1-MMP or STAT3 abrogated ConA-induced STAT3 phosphorylation (Fig.3B). Treatment with the pan-JAK inhibitor Tofacitinib also antagonized ConA-induced STAT3 phosphorylation (Fig.3C). Collectively, these observations lead us to conclude that selective JAK family members are required in the transcriptional regulation of CSF.

3.4. *Evidence for selective JAK involvement in ConA-induced CSF-2 and CSF-3 gene expression.*

Given the above evidence of some Janus Kinase family members' implication in the transcriptional regulation of CSF, we next specifically silenced each of the JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 members using siRNA strategy with silencing efficiency ranging from 78-96% (Fig.4A). SiRNA-transfected and serum-starved cells were next treated with ConA and qRT-PCR was performed to monitor the impact of silencing each JAK member on the induction of CSF-1, CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression. Regardless of which JAK member was silenced, we found very low (5-18%) diminution of ConA-induced CSF-1 gene expression (Fig.4B). In contrast, silencing of JAK2 significantly abrogated ConA-

induced CSF-2 and MT1-MMP, while silencing of JAK1 and of JAK3 significantly decreased ConA-induced CSF-3 gene expression. TYK2 silencing only moderately impacted ConA-induced CSF-3 (Fig.4B).

4. DISCUSSION

Angiogenic activity of classical hematopoietic cytokines has been reported in different experimental models, including wound healing, chronic inflammation, and tumor growth (Ribatti, 2012). Interestingly, recent identification and functional study of cytokines and chemokines involved in tumorigenesis confirm that MSC exert paracrine regulation of angiogenesis, tumor cell proliferation and apoptosis (Zeng *et al*, 2012), and may affect cancer progression through various cell signalling pathways (Torsvik & Bjerkvig, 2012). In parallel, accumulating evidence supports the involvement of MSC in cancer pathogenesis, as reflected by their homing to vascularizing tumors and adaptive capacity to a hypoxic environment (Annabi *et al*, 2004; Cuiffo & Karnoub, 2012). Although the impact of these contributions remains poorly understood, MSC are becoming further appreciated as critical components of the tumor microenvironment where they also suppress antitumor immune responses (Krampera *et al*, 2003; Klopp *et al*, 2011). Given the immunomodulatory and proangiogenic functions exerted by cytokines and the roles that MSC play in brain tumor development, we provide evidence that a subset of cytokines from the CSF family may significantly contribute to the paracrine angiogenic/immunomodulatory properties of MSC.

In the current study, we also specifically provide evidence for transcriptional regulation of CSF-2 and CSF-3 in activated MSC paracrine proangiogenic phenotype. Interestingly, the vasculogenic and angiogenic properties of MSC have already been inferred (Copland *et al*, 2008), but the exact paracrine mechanisms unknown. Here, we confirm that CSF-2 and CSF-3 gene expression is increased upon MSC activation by ConA. Given CSF-2 and CSF-3 are known inducers of endothelial cells (Bussolino *et al*, 1991), one may confidently infer that the increases observed in MSC in CSF may, in part, explain their paracrine proangiogenic phenotype. This is supported by the fact that CSF-2 acts as an inducer of endothelial cell migration and proliferation related to angiogenesis (Bussolino *et al*, 1991), and that it induces angiogenesis in rat connective tissue by a direct effect on endothelial cells or by the recruitment and activation of macrophages that release their own angiogenic factors (Rubbia-Brandt *et al*, 1991). In support of this, subnanomolar concentrations of CSF-2 and CSF-3 were found to induce the proliferation of endothelial cells derived from human vessels

(Bussolino *et al*, 1991), and from murine microvascular capillaries (Bocchietto *et al*, 1993). Suggestion of an autocrine growth regulation by CSF-2 and CSF-3 was also reported in human gliomas (Mueller *et al*, 1999). In fact, CSF-2 has recently been confirmed to have an effective role in the evolution and pathogenesis of high grade gliomas which also express high levels of the CSF-2 receptor (Revoltella *et al*, 2012), whereas sustained proliferative signalling from CSF-3 was recently inferred to contribute to glioma genesis and recurrence (Wang *et al*, 2012). In the present study, we demonstrate that lectin-activated MSC promotes CSF transcription through selective JAK/STAT3 signalling.

STAT transcription factors are mostly dedicated to hematopoiesis and immunity, and crosstalk between JAK/STAT and TLR has been inferred (Hu *et al*, 2007) in several MSC functions intrinsically linked to TLR signalling and immune crosstalk (Auletta *et al*, 2012). Concanavalin-A is documented as a TLR-2 and TLR-6 agonist. Accordingly, TLR-2 and TLR-6 gene expression was confirmed in previous reports (Unitt & Hornigold, 2011). How their expression specifically affects ConA-induced CSF-2 and CSF-3 transcription will need further experimentation. Preliminary results from our laboratory suggest that gene silencing of either TLR-2 or TLR-6 abrogated ConA-mediated induction of CSF-2 and of CSF-3 (not shown). Given that ConA-activated MSC were previously shown to involve MT1-MMP intracellular signalling, we now further define an unreported intracellular signalling function of MT1-MMP in the regulation of cytokine expression requiring STAT3 as an intermediate. This links both MT1-MMP's intracellular domain-mediated signalling function to its intrinsic extracellular domain-mediated matrix hydrolysis and promotion of cell migration. This may also, in part, explain some of the immunosuppressive properties of activated MSC, which ultimately concurs to facilitate MSC recruitment by a tumor and evasion from the immune system.

Membrane-bound MMPs, such as MT1-MMP, have recently become critical pharmacological targets in angiogenesis-related disease treatment (Arroyo *et al*, 2007). In light of our data, one can therefore envision that targeting the MT1-MMP/JAK/STAT signaling axis may also significantly impact on MSC paracrine angiogenic properties. Accordingly, preclinical proof of principle rationale was recently provided for the design and

development of novel and selective MT1-MMP inhibitors (Sina *et al*, 2009; Remacle *et al*, 2012), while impact on lymphangiogenesis with selective targeting of MT1-MMP was also recently achieved through the use of specific monoclonal antibodies (Ingvarsen *et al*, 2013). How these inhibitors of MT1-MMP catalytic and signalling functions will remain to be better investigated with relation to any transcriptional regulation.

Interestingly, ConA-mediated activation of MSC was shown to trigger cyclooxygenase (COX)-2 expression (Akla *et al*, 2012), which ultimate end-product metabolite prostaglandin E2 is involved in the inhibition of cytokine release by T cells (Zinöcker & Vaage, 2012) and of T cell activation and proliferation (Duffy *et al*, 2011). MT1-MMP involvement in the major histocompatibility complex (MHC) class I was also recently suggested. Interestingly, phenotypic characterization of MSC by flow cytometry showed expression of MHC class I alloantigens (Klyushnenkova *et al*, 2005). Shedding of the tumor cell surface MHC class I chain-related molecule A by MT1-MMP was demonstrated to regulate sensitivity of tumor cells to NK cell killing, a process which may add to tumor immune evasion by MSC and contribute to tumor progression (Liu *et al*, 2010). Such cell surface proteolytic activity of MT1-MMP was also shown in MSC to contribute to cleavage of CD44, another cell adhesion molecule expressed at the cell surface of MSC, and known to promote cell migration (Kajita *et al*, 2001; Annabi *et al*, 2004).

In conclusion, along with the demonstrated existence of a signalling axis linking MT1-MMP to the JAK/STAT pathway in MSC, this study further unravels the impact that this signalling axis may exert on CSF transcriptional regulation on the paracrine pro-angiogenic and immunomodulatory properties of MSC. We further identified the JAK family members involved in selective transcriptional regulation of CSF-2 and CSF-3 (Fig.5). Our data now allow the potential design and assessment of multi-targeted inhibitory approaches of the JAK/STAT pathway which may thereof offer greater therapeutic efficacy to counteract MSC angiogenic/immunomodulatory contributions to brain tumor development.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments : BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). EPB is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) summer fellowship awardee. This study was funded by a grant from the NSERC to BA.

FIGURES

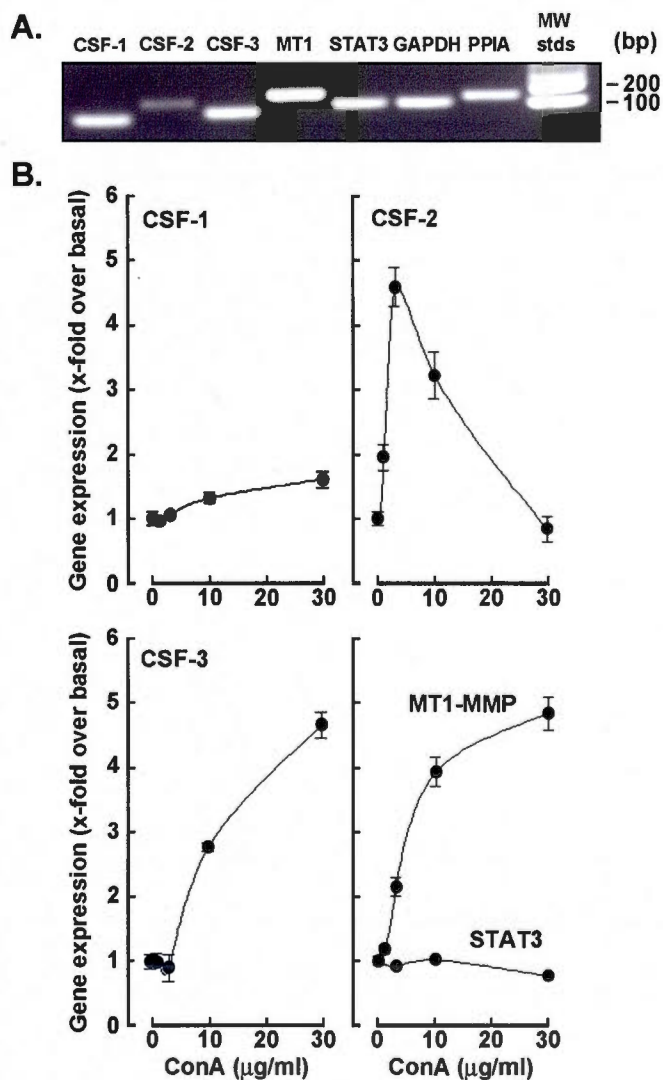


Fig.1 : Concanavalin-A transcriptional regulation of CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with various concentrations of Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess gene expression. (A) A representative agarose gel of the corresponding single product amplicons is shown. (B) A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates.

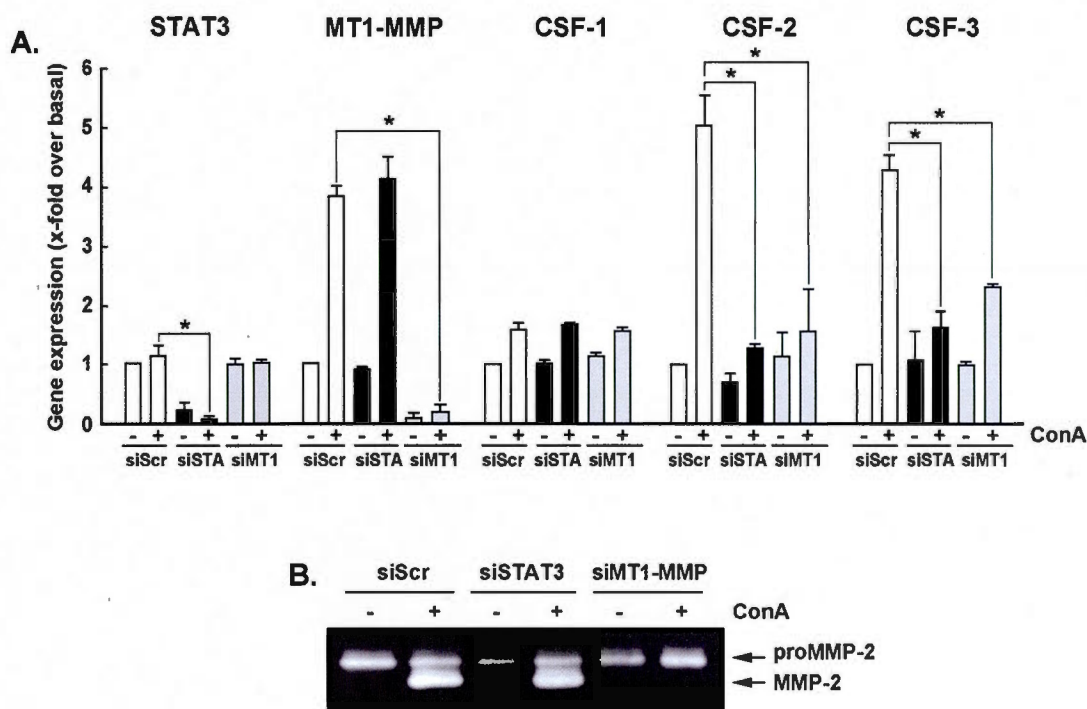


Fig.2 : MT1-MMP or STAT3 gene silencing abrogates ConA-induced CSF-2, and CSF-3 transcriptional regulation. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScr), STAT3 siRNA (siSTA), or MT1-MMP siRNA (siMT1) as described in the Methods section. (A) Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess STAT3, MT1-MMP, CSF-1, CSF-2, and CSF-3 gene expression upon treatment with or without 30 μ g/ml of Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. (B) Conditioned media was isolated from the serum-starved and ConA-treated transfected cells, and gelatin zymography performed as described in the Methods section to assess the extent of proMMP-2 activation.

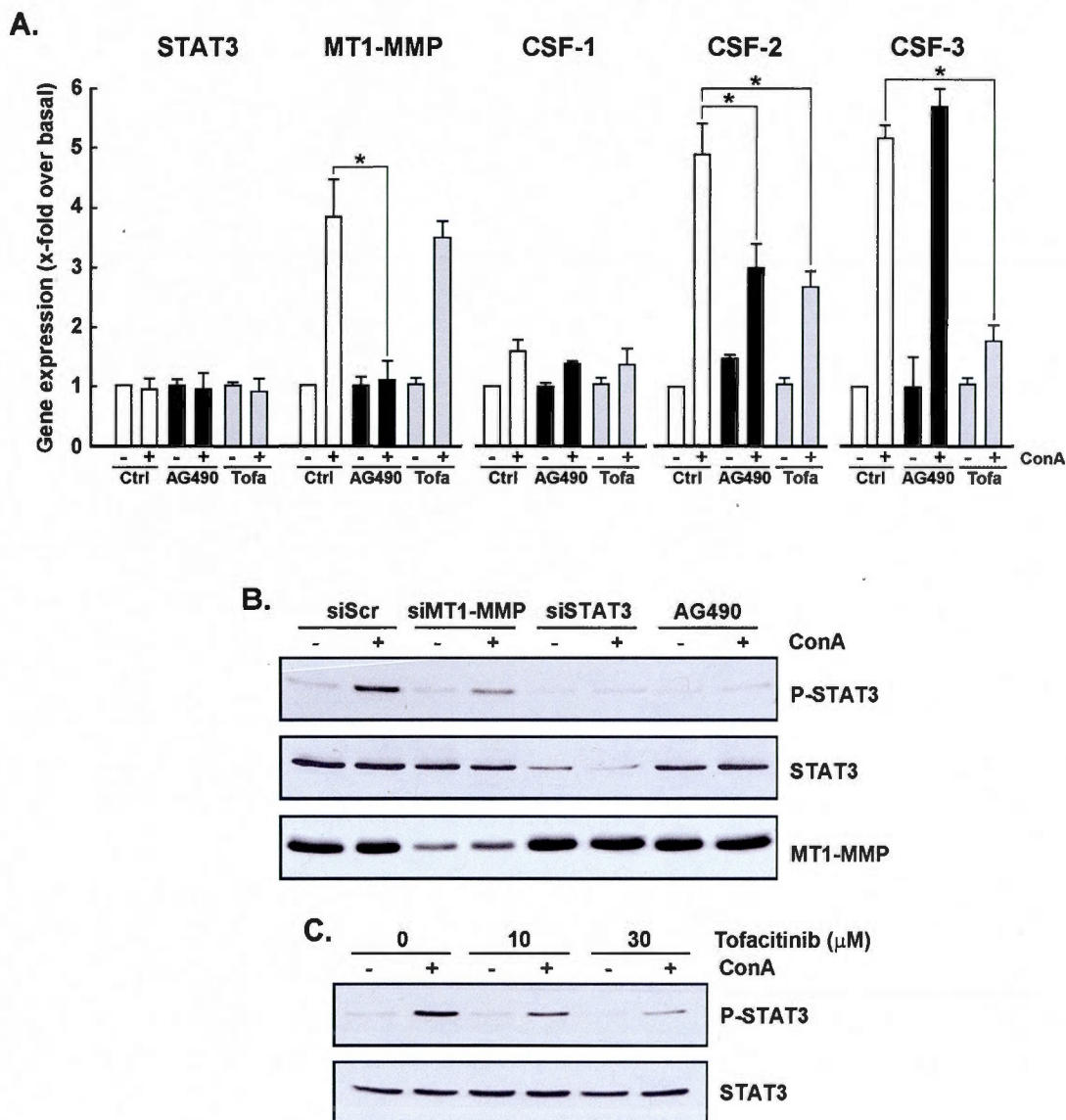


Fig.3 : Pharmacological inhibition of JAK family members selectively antagonizes ConA-mediated increases of MT1-MMP, CSF-1, -2, and -3. (A) Subconfluent MSC were serum-starved and treated with 10 μ M of the JAK2 inhibitor AG490 (black bars) or the pan-JAK inhibitor Tofacitinib (grey bars), in the presence or absence of 30 μ g/ml Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess gene expression. (B) MT1-MMP and STAT3 gene

silencing was performed as described in the Methods section, and then cells were treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for 1 hour. Cell lysates were isolated, then Western blotting and immunodetection were performed with anti-STAT3, anti-phosphoSTAT3, and anti-MT1-MMP antibodies as described in the Methods section. (C) Cells were pre-incubated for 30 minutes in the presence of Tofacitinib and then treated with ConA for 1 hour. Cell lysates were isolated, and then Western blotting and immunodetection were performed with anti-STAT3 and anti-phosphoSTAT3 antibodies as described in the Methods section.

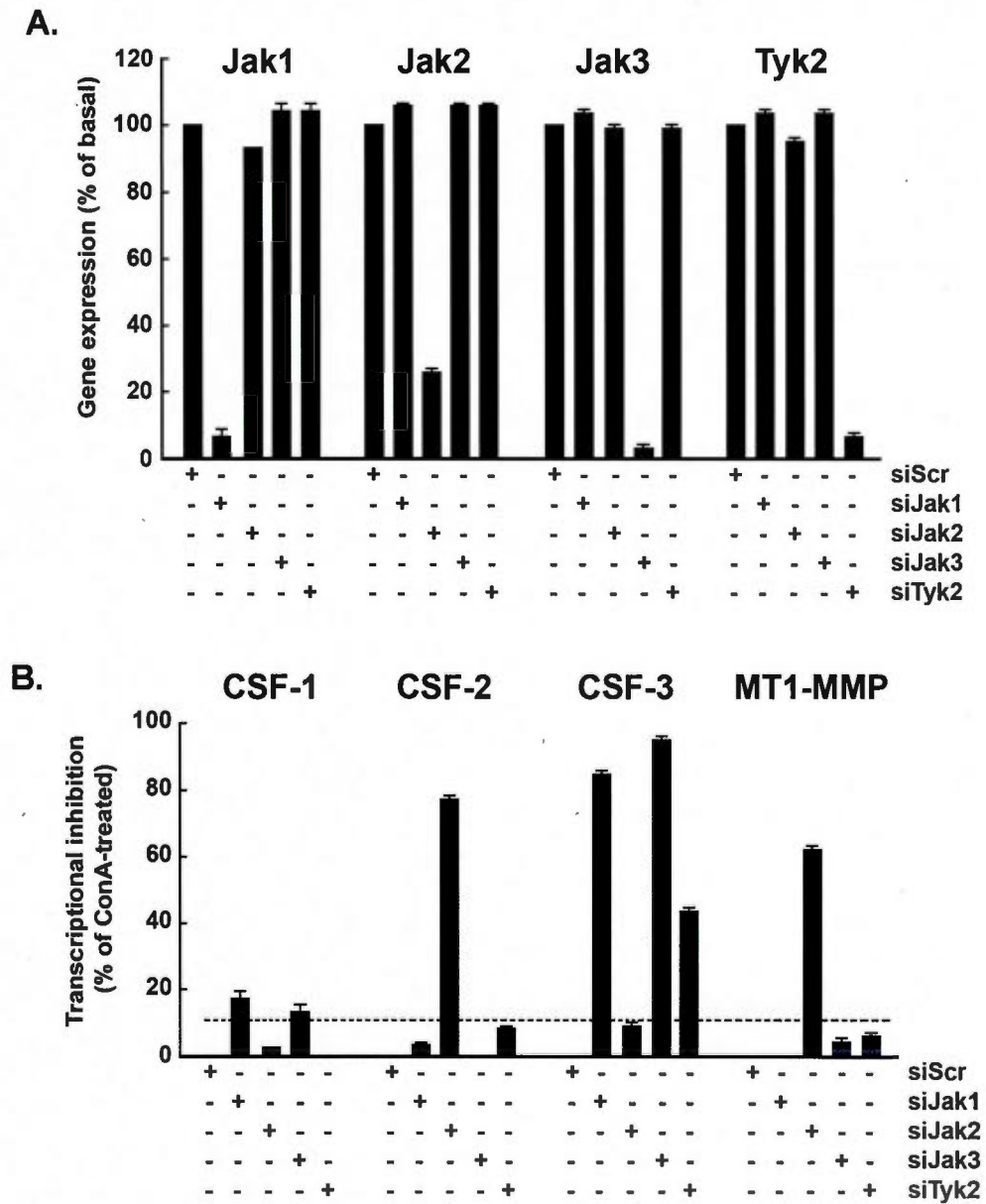


Fig.4 : Evidence for selective JAK involvement in ConA-induced CSF-2 and CSF-3 gene expression. JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 gene silencing was performed as described in the Methods section. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess (A) silencing efficacy and (B) impact upon ConA-induced CSF-1, CSF-2, CSF-3, and MT1-MMP gene expression.

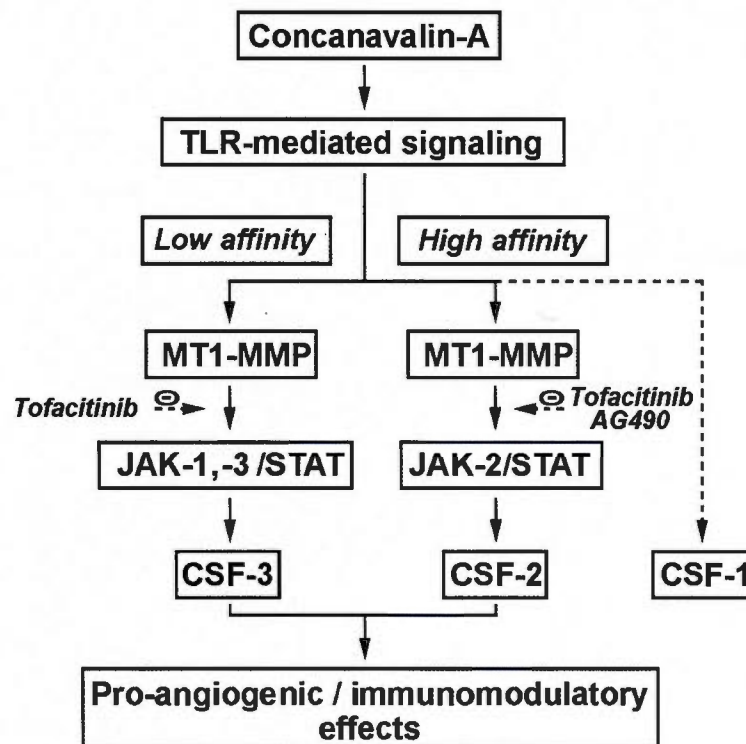


Fig.5 : Schematic representation of the signalling partners involved in the transcriptional regulation of angiogenic CSF-2 and -3. Activation of MSC with Concanavalin-A (ConA) triggers cell surface-mediated Toll-Like Receptor (TLR) signalling. High ConA concentrations (low affinity effect) promotes MT1-MMP-mediated CSF-3 transcriptional induction through a JAK-1,-3/STAT pathway. On the other hand, low ConA concentrations (high affinity effect) promote MT1-MMP-mediated CSF-2 transcriptional regulation through a JAK-2/STAT pathway. ConA-mediated CSF-2 and -3 is thought to contribute to MSC's pro-angiogenic and immunomodulatory effects. High ConA concentrations also contribute, to some extent, to CSF-1 transcriptional regulation through a MT1-MMP/JAK/STAT-independent pathway.

CHAPITRE V

DISCUSSION

L'angiogenèse tumorale est une condition pathologique qui résulte du déploiement aberrant de l'angiogenèse normale, un processus permettant la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants (Papetti et Herman, 2002). Ce processus, utilisé par les cellules cancéreuses, est essentiel pour la croissance tumorale et la métastase (Weidner, 1993). Le microenvironnement tumoral est formé des cellules non cancéreuses et leur stroma telles les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules de la moelle osseuse et les péricytes qui sécrètent de nombreuses molécules affectant la réponse angiogénique (Li *et al*, 2007). Ainsi, la nécessité d'un contrôle de l'angiogenèse tumorale basé sur la compréhension des mécanismes moléculaires et savoir comment à la fois les cellules et les molécules interagissent fonctionnellement comme activateurs ou inhibiteurs angiogéniques permettra l'élaboration de stratégies thérapeutiques visant à limiter la progression tumorale (Weis et Cheresh, 2011).

L'expression des CSF-2 et CSF-3 : Quelle importance dans l'angiogenèse tumorale ?

Les chimiokines jouent un rôle important dans la migration et dans le recrutement des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales progénitrices vers les tumeurs (Bautz *et al*, 2001). Parmi ces cellules, les MSC ont souvent été reliées à la croissance tumorale en affectant différentes voies de signalisations cellulaires (Torsyik et Bjerkvig, 2013). Ces cellules migrent vers les tumeurs et contribuent à la modulation du système immunitaire en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale facilitant la croissance tumorale, la résistance à différents médicaments anti-cancer, l'angiogenèse et la métastase (Houthuijzen *et al*, 2012). En effet, plusieurs études ont montré que les cytokines pro-angiogéniques sécrétées par les MSC contribuent au processus d'angiogenèse impliqué dans la cicatrisation des plaies (Wu *et al*, 2007) mais aussi à la progression tumorale (De Luca *et al*, 2012). De manière intéressante, plusieurs facteurs de croissance, incluant le VEGF, FGF, GM-CSF et G-CSF,

peuvent agir comme des facteurs paracrines induisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales et contribuer à la vascularisation des tumeurs (Ribatti *et al*, 1999). On peut donc annoncer que les cytokines sécrétées par les MSC joueraient un rôle important dans la régulation des propriétés immunomodulatrices et angiogéniques. Attendu que les CSF font partie de ces cytokines, nous suggérons qu'elles contribuent aux fonctions angiogéniques/immunomodulatrices dans les cellules MSC par effet paracrine.

Il est accepté que les MSC jouent un rôle important dans l'angiogenèse tumorale en partie grâce à la sécrétion de différentes cytokines (Beckermann *et al*, 2008). Les mécanismes paracrines exactes et les voies de signalisation impliquées dans ce processus demeurent cependant peu étudiés. Dans notre étude, nous avons tenté de documenter les voies de signalisation responsables de la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 dans un modèle de cellules MSC activées. Nous avons montré que l'expression génique de CSF-2 et CSF-3 est augmentée dans les MSC suite à un traitement à la ConA. L'implication des CSF-2 et des CSF-3 dans la régulation de la progression tumorale rend ces facteurs davantage des indicateurs pronostiques et soulève la réflexion quant à leur utilisation dans le traitement du cancer (Mueller *et al*, 1999). En effet, CSF-2 et CSF-3 stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et jouent un rôle dans l'angiogenèse (Bussolino *et al*, 1991). De par son rôle dans la stimulation, la viabilité, la prolifération et la migration des cellules progénitrices endothéliales (EPC) impliquées dans la formation de nouveaux tubules, le CSF-2 induit la surexpression des intégrines $\beta 2$ et du VEGF dans les EPC (Zhao et Yang, 2010). Le CSF-3, documenté pour son rôle dans la mobilisation des cellules souches et progénitrices vers les tumeurs, a été montré pour avoir un rôle dans l'angiogenèse. En effet, le CSF-3 induit la migration des neutrophiles qui forment une source riche de VEGF, un puissant facteur angiogénique induit suite à la stimulation par le CSF-3 ce qui permet la mobilisation des EPC et des cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) de la moelle osseuse vers les tumeurs pour contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux (Ohki *et al*, 2005). Dans notre étude, nous mettons en évidence le rôle important que joue le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3.

Un nouveau rôle pour MT1-MMP dans la régulation de CSF-2 et de CSF-3 dans les MSC

Plusieurs études confirment le rôle important que joue la MT1-MMP dans les processus physiologiques et pathologiques (Bauvois, 2004) tels l'inflammation, la cicatrisation des plaies, l'athérosclérose et le développement osseux (Rodriguez *et al*, 2010). De plus, l'expression de MT1-MMP est augmentée dans différents types de cancers tels le cancer des poumons, des seins, du cerveau, du cou et du foie, indiquant sa contribution dans la métastase, l'angiogenèse, l'invasion et la progression tumorale (Kessenbrock *et al*, 2010). En plus de son rôle dans l'invasion et la migration cellulaire due à sa capacité catalytique à dégrader les diverses composantes de la MEC telles les laminines, les collagènes, les fibrines et les fibronectines, et à activer la pro-MMP-2 (Itoh, 2006), il a été montré que la MT1-MMP est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires via son domaine cytoplasmique (Kessenbrock *et al*, 2010). En effet, ce domaine intracellulaire est responsable de plusieurs processus biologiques par l'activation de différentes voies de signalisation telle la voie TGFbeta/Alk5 impliquée dans l'angiogenèse (Alfranka *et al*, 2008). Dans notre étude, nous démontrons que la MT1-MMP permet la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 via son domaine cytoplasmique. Pour valider notre hypothèse, nous avons utilisé deux méthodes dont la première consiste à inhiber l'expression génique de MT1-MMP à l'aide de siRNA et la deuxième nécessite la surexpression d'une MT1-MMP « sauvage » et d'une MT1-MMP dont le domaine cytoplasmique a été délété.

La surexpression de MT1-MMP par les cellules cancéreuses permet la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques, surtout les MSC, et les cellules progénitrices endothéliales aux microenvironnements tumoraux via la signalisation médiée par son domaine cytoplasmique (Matias-Roman *et al*, 2005 ; Son *et al*, 2006). De plus, ce domaine est impliqué dans la régulation de différentes cytokines. En effet, une surexpression de MT1-MMP induit l'expression du VEGF-A responsable de la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase (Eisenach *et al*, 2010). Ainsi, on peut conclure que la MT1-MMP est une protéine nécessaire à l'angiogenèse tumorale non seulement parce qu'elle est impliquée dans la dégradation de la MEC mais aussi par son rôle dans la régulation de plusieurs facteurs pro-

angiogéniques. Sachant que la signalisation intracellulaire induite par MT1-MMP est impliquée dans l'activation des MSC, nous définissons une nouvelle fonction de signalisation intracellulaire peu documentée de MT1-MMP dans la régulation des cytokines CSF-2 et CSF-3.

Un axe de signalisation TLR2-6/ MT1-MMP/Stat3 impliqué dans la régulation de CSF-2 et de CSF-3 dans les MSC

Les TLR, exprimés par les MSC, sont responsables de l'induction de plusieurs voies de signalisations intracellulaire impliquées dans différents processus (Romieu-Mourez *et al*, 2009). En effet, les TLR contribuent à la prolifération, la différenciation, la migration et l'immunomodulation des MSC (Pevsner-Fischer *et al*, 2007 ; Bunnell *et al*, 2010). De plus, plusieurs études ont montré le rôle important que jouent les TLR dans la progression tumorale, l'angiogenèse, l'invasion, la métastase et l'inflammation (Bhattacharya et Yusuf, 2012). Les lectines, utilisées par l'industrie pharmaceutique pour étudier différents processus biologiques incluant la mitogénicité et l'inflammation, sont des modulateurs importants des TLR (Kanellopoulos *et al*, 1985 ; Ferriz-Martinez *et al*, 2010). Nous avons utilisé la ConA, extraite de la lectine *Canavalia ensiformis*, qui stimule la signalisation induite par TLR2/6 et qui contribue aux fonctions angiogéniques et immunomodulatoires des MSC (Annabi *et al*, 2003; Scheibe *et al*, 2012). Dans notre étude, nous confirmons, en inhibant TLR2 et TLR6 par des siRNA, que la signalisation en aval de TLR2 et de TLR6 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 induite par la ConA via MT1-MMP.

Dans le but de savoir comment l'expression des TLR2/6 affecte la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et de CSF-3, la voie de signalisation MT1-MMP/Stat3 a été étudiée dans les MSC considérant son rôle dans l'induction une réponse inflammatoire suite à une stimulation par la ConA (Akla *et al*, 2012). De plus, nous avons évalué la contribution des protéines kinases en aval de MT1-MMP possiblement responsables de l'activation de Stat3 telles les protéines de la famille des Janus Kinases JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, et des protéines de la famille de

Src pour mieux comprendre l'axe de signalisation impliqué dans la régulation transcriptionnelle des CSF. En effet, les protéines qui forment les membres de la famille de Src sont des protéines kinases qui peuvent être activées par des facteurs de croissance, des intégrines ou des récepteurs membranaires de cytokines (Parsons et Parsons, 2004). Une fois activée par autophosphorylation, la protéine Src interagit avec des récepteurs tyrosine kinases intracellulaires pour induire différentes voies de signalisation (Ishizawar et Parsons, 2004). A ce titre, Src permet entre autre l'activation du récepteur tyrosine kinase EGFR qui induit l'activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT pour contribuer à la croissance cellulaire, la survie et l'angiogenèse dans les cellules cancéreuses du poumon (Biscardi *et al*, 1999 ; Laurent-Puig *et al*, 2009). Plusieurs études ont montré la surexpression de Src dans les tumeurs. En effet, cette surexpression protéique de Src contribue à l'invasion, la prolifération, la survie et l'angiogenèse tumorale (Johnson *et al*, 2006). La famille des protéines Src activent différentes protéines Stat (Kloth *et al*, 2003). La protéine Src peut contribuer à la progression tumorale en se liant au récepteur tyrosine kinase de Stat3 pour induire sa phosphorylation (Yu *et al*, 2007) (Figure 13). Ainsi, Src contribue à la régulation de CSF-2 (Bunda *et al*, 2013) et CSF-3 (Sampson *et al*, 2007). De plus, plusieurs études ont montré la contribution des voies JAK1/Stat3 (Lin *et al*, 2012), JAK2/Stat3 (Ji *et al*, 2012), JAK3/Stat3 (Tu *et al*, 2013) dans le processus d'angiogenèse. Dans notre étude, nous montrons que, suite à une activation par la ConA, l'activation des voies de signalisation Src kinases et JAK/Stat3 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle des CSF-2 et CSF-3, et cela nécessite la contribution de la MT1-MMP.

Nous avons également étudié le rôle du résidu d'acide aminé Tyr⁵⁷³ localisé au niveau du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP en surexprimant un plasmide MT1-MMP présentant une mutation au niveau du résidu Tyr⁵⁷³. Ce résidu permet la régulation de CSF-2 et CSF-3 via la voie de signalisation Src/Stat3. Ainsi, la Tyr⁵⁷³ est responsable de la liaison des protéines adaptatrices telle la p130Cas pour réguler l'activité de Rac1 dans les cellules myéloïdes progénitrices (Gonzalo et Arroyo, 2010). De par son impact direct dans la migration des cellules endothéliales (Nyalendo *et al*, 2007), ainsi que dans la prolifération des cellules tumorales et dans l'inhibition de la croissance tumorale dans les souris (Nyalendo *et al*, 2008), le résidu Tyr⁵⁷³ du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP contribue aussi

significativement au processus d'invasion cellulaire d'une façon indirecte, en régulant l'ubiquitination du résidu Lys⁵⁸¹ de la MT1-MMP (Eisenach *et al*, 2012). Dans notre étude, nous avons montré que la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3, impliqués dans l'angiogenèse des cellules tumorales, via la voie de signalisation TLR2-6/MT1-MMP/ Src et/ou JAK/Stat3 nécessite l'implication cruciale du résidu Tyr⁵⁷³ de la MT1-MMP.

Un nouveau rôle chimiopréventif de l'EGCG dans la régulation de CSF-2 et de CSF-3 dans les MSC

Enfin, nous avons étudié l'effet de l'epigallocatechin gallate (EGCG), un polyphénol du thé vert, sur l'induction transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 par la ConA et la MT1-MMP. L'EGCG, la catéchine la plus abondante du thé vert, possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires lui permettant de protéger les composantes de la cellule des dommages oxydatifs dus aux radicaux libres (Cavet *et al*, 2011). De plus, il a été montré que l'EGCG possède un potentiel thérapeutique remarquable dans plusieurs types de cancers humains (De Amicis *et al*, 2013). En effet, l'EGCG semble augmenter l'expression des biomarqueurs épithéliaux et diminuer l'expression des biomarqueurs mésenchymaux, ce qui contribue à sa capacité d'inhiber l'invasion et la migration des cellules cancéreuses ainsi que la métastase (Singh et Katiyar, 2011). D'autres études ont montré des propriétés anti-angiogéniques et apoptotiques de l'EGCG ainsi que son abilité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Zhang *et al*, 2012). Des études *in vitro* ont démontré que l'EGCG bloque la carcinogenèse, selon différents mécanismes d'actions, en affectant différentes voies de signalisation dont les voies de JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT, Wnt et Notch (Singh *et al*, 2011), ainsi son rôle dans l'inhibition du TLR-2 (Byun *et al*, 2011) et du MT1-MMP (Yamakawa *et al*, 2004). Dans notre étude, nous avons montré un rôle chimio-préventif de l'EGCG permettant d'inhiber l'expression des facteurs pro-angiogéniques, CSF-2 et CSF-3, impliqués dans la progression tumorale suite à une induction par la ConA ou par la MT1-MMP. Selon la théorie et nos résultats, l'EGCG pourrait donc agir au niveau du récepteur TLR-2, de la voie de signalisation Src et JAK/Stat et/ou au niveau de la MT1-MMP.

Conclusions et perspectives

La compréhension des voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale et la découverte d'inhibiteurs pharmacologiques pouvant agir sur ces voies forment deux aspects importants dans la prévention du cancer. Dans notre étude, nous avons mis en évidence un nouveau rôle non-protéolytique de la MT1-MMP impliquant le résidu Tyr⁵⁷³ de son domaine cytoplasmique dans la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3. De plus, nous démontrons l'implication de la voie de signalisation TLR2-6/MT1-MMP/Src kinase et/ou JAK/STAT dans la régulation transcriptionnelle de CSF-2 et CSF-3 et dans les propriétés paracrine pro-angiogéniques et immunomodulatrices des MSC (Figure 5.1). Nous avons aussi identifié les membres de la famille des JAK qui sont impliqués dans la régulation des CSF. Nos données permettent maintenant d'ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'évaluation des approches inhibiteurs multi-cibles de notre voie, afin de diminuer les effets angiogéniques et immunomodulateurs des MSC dans la progression tumorale. Aussi, vu le rôle important de l'EGCG au niveau de plusieurs processus contribuant à la progression tumorale, nous documentons sa capacité à inhiber l'expression génique de CSF-2 et CSF-3, ainsi que les différentes composantes de la voie de signalisation. Sachant que les MSC sont recrutées au cours de la vascularisation tumorale ainsi que dans l'angiogenèse, possiblement via la sécrétion de CSF-2 et CSF-3, notre étude suggère que l'EGCG pourra jouer un rôle chimio-préventif en ciblant les fonctions signalitiques de la MT1-MMP. Sachant que les MSC migrant vers les tumeurs sont en hypoxie, il serait important d'évaluer l'effet de l'EGCG sur la régulation transcriptionnelle sur des MSC hypoxiques afin de trouver une concentration optimale d'inhibition. Enfin, le rôle important de la MT1-MMP dans la progression tumorale la rend une cible thérapeutique surtout que la thérapie génique n'a pas encore porté beaucoup de fruits. Donc les inhibiteurs/anticorps ciblant les enzymes, tel la MT1-MMP, seront une nouvelle stratégie à évaluer dans le développement de stratégies complémentaires à la chimioprévention via l'EGCG.

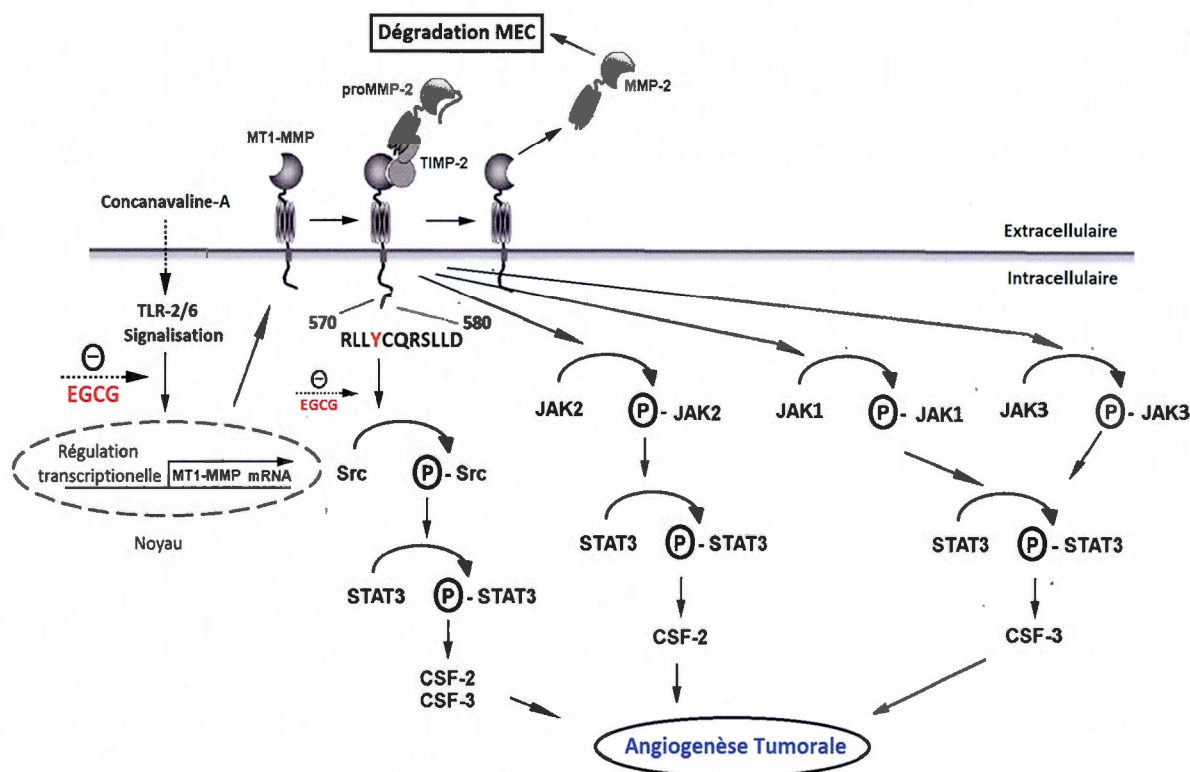


Figure 5.1 Schéma récapitulatif de l'effet de l'EGCG sur la voie de signalisation responsable de la régulation de CSF-2 et CSF-3 médié par la conA et la MT1-MMP. Dans notre étude, nous montrons que la ConA induit la transcription de MT1-MMP, CSF-2 et CSF-3 possiblement via la voie de signalisation TLR2-6/MT1-MMP/ Src kinase et JAK/Stat3. La surexpression de MT1-MMP au niveau génique et protéique est responsable de la phosphorylation de Src, JAK1, JAK2, JAK3 et Stat3. De plus, nous démontrons que la Tyr⁵⁷³ du domaine cytoplasmique de MT1-MMP est responsable de la phosphorylation de Src. Enfin, nous suggérons que le polyphénol du thé vert, l'EGCG, peut inhiber l'expression génique de CSF-2 et CSF-3 en inhibant la signalisation dépendante de la ConA et de la MT1-MMP.

RÉFÉRENCES

- Abarrategi, A., L. Marinas-Pardo, I. Mirones, E. Rincon et J. Garcia-Castro. 2011. «Mesenchymal niches of bone marrow in cancer». *Clin Transl Oncol*, vol. 13, no 9, p. 611-616.
- Agrawal, M., R. J. Garg, J. Cortes, H. Kantarjian, S. Verstovsek et A. Quintas-Cardama. 2011. «Experimental therapeutics for patients with myeloproliferative neoplasias». *Cancer*, vol. 117, no 4, p. 662-676.
- Akira, S., et K. Takeda. 2004. «Toll-like receptor signalling». *Nat Rev Immunol*, vol. 4, no 7, p. 499-511.
- Akla, N., J. Pratt et B. Annabi. 2012. «Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells». *Exp Cell Res*, vol. 318, no 19, p. 2498-2506.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison et M. F. Clarke. 2003. «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no 7, p. 3983-3988.
- Al-Khalidi, A., H. Al-Sabti, J. Galipeau et K. Lachapelle. 2003. «Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model». *Ann Thorac Surg*, vol. 75, no 1, p. 204-209.
- Alfranca, A., J. M. Lopez-Oliva, L. Genis, D. Lopez-Maderuelo, I. Mirones, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo et J. M. Redondo. 2008. «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway». *Blood*, vol. 112, no 4, p. 1120-1128.
- Ando, K., T. Ishibashi, H. Ohkawara, N. Inoue, K. Sugimoto, H. Uekita, C. Hu, Y. Okamoto, Y. Takuwa et Y. Takeishi. 2011. «Crucial role of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1- MMP) in RhoA/Rac1-dependent signaling pathways in thrombin- stimulated endothelial cells». *J Atheroscler Thromb*, vol. 18, no 9, p. 762-773.

- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2005. «Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCg». *J Neurochem*, vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1542, no 1-3, p. 209-220.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Beliveau. 2009. «A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells». *J Neuroinflammation*, vol. 6, p. 8.
- Annabi, B., E. Naud, Y. T. Lee, N. Eliopoulos et J. Galipeau. 2004a. «Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors». *J Cell Biochem*, vol. 91, no 6, p. 1146-1158.
- Annabi, B., S. Thibeault, Y. T. Lee, N. Bousquet-Gagnon, N. Eliopoulos, S. Barrette, J. Galipeau et R. Beliveau. 2003. «Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells». *Exp Hematol*, vol. 31, no 7, p. 640-649.
- Annabi, B., S. Thibeault, R. Moumdjian et R. Beliveau. 2004b. «Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells». *J Biol Chem*, vol. 279, no 21, p. 21888-21896.
- Apte, S. S., N. Fukui, D. R. Beier et B. R. Olsen. 1997. «The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis». *J Biol Chem*, vol. 272, no 41, p. 25511-25517.
- Arroyo, A. G., L. Genis, P. Gonzalo, S. Matias-Roman, A. Pollan et B. G. Galvez. 2007. «Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease». *Curr Pharm Des*, vol. 13, no 17, p. 1787-1802.

- Auletta, J. J., R. J. Deans et A. M. Bartholomew. 2012. «Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense». *Blood*, vol. 119, no 8, p. 1801-1809.
- Bandaranayake, R. M., D. Ungureanu, Y. Shan, D. E. Shaw, O. Silvennoinen et S. R. Hubbard. 2012. «Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 19, no 8, p. 754-759.
- Barry, F. P., et J. M. Murphy. 2004. «Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 36, no 4, p. 568-584.
- Bautz, F., C. Denzlinger, L. Kanz et R. Mohle. 2001. «Chemotaxis and transendothelial migration of CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1». *Blood*, vol. 97, no 11, p. 3433-3440.
- Bauvois, B. 2004. «Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?». *Oncogene*, vol. 23, no 2, p. 317-329.
- Beck, L., Jr., et P. A. D'Amore. 1997. «Vascular development: cellular and molecular regulation». *FASEB J*, vol. 11, no 5, p. 365-373.
- Beckermann, B. M., G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A. V. Salnikov, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A. D. Ho, N. Giese, M. W. Buchler, H. Friess, P. Buchler et I. Herr. 2008. «VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma». *Br J Cancer*, vol. 99, no 4, p. 622-631.
- Beckman, R. A., et L. A. Løeb. 2005. «Genetic instability in cancer: theory and experiment». *Semin Cancer Biol*, vol. 15, no 6, p. 423-435.
- Béliveau, Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer. La prévention du cancer par l'alimentation*, Éditions Trécarré : 2005 p.213
- Bergfeld, S. A., et Y. A. DeClerck. 2010. «Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 29, no 2, p. 249-261.
- Bexell, D., S. Gunnarsson, A. Tormin, A. Darabi, D. Gisselsson, L. Roybon, S. Scheding et J. Bengzon. 2009. «Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as

- pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas». *Mol Ther*, vol. 17, no 1, p. 183-190.
- Bhatia, M., J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet et J. E. Dick. 1997. «Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no 10, p. 5320-5325.
- Bhattacharya, D., et N. Yusuf. 2012. «Expression of toll-like receptors on breast tumors: taking a toll on tumor microenvironment». *Int J Breast Cancer*, vol. 2012, p. 716564.
- Birnbaum, T., J. Roider, C. J. Schankin, C. S. Padovan, C. Schichor, R. Goldbrunner et A. Straube. 2007. «Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines». *J Neurooncol*, vol. 83, no 3, p. 241-247.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu et S. J. Parsons. 1999. «c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function». *J Biol Chem*, vol. 274, no 12, p. 8335-8343.
- Blais M. et S. Chemtob. L'impact des cellules souches issues de la moelle sur la néovascularisation dans un modèle de souris de rétinopathie induite par l'oxygène. Université de Montréal. 2011.
- Bocchietto, E., A. Guglielmetti, F. Silvagno, G. Taraboletti, G. P. Pescarmona, A. Mantovani et F. Bussolino. 1993. «Proliferative and migratory responses of murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony-stimulating factor». *J Cell Physiol*, vol. 155, no 1, p. 89-95.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, H. Tschesche, F. Grams, H. Nagase et K. Maskos. 1999. «Structural properties of matrix metalloproteinases». *Cell Mol Life Sci*, vol. 55, no 4, p. 639-652.
- Bongso A. et E.H. Lee. *Stem Cells : From Bench to Bedside*. World Scientific Publishing. 2005. National University of Singapore.
- Borghese, C., L. Cattaruzza, E. Pivetta, N. Normanno, A. De Luca, M. Mazzucato, M. Celegato, A. Colombatti et D. Aldinucci. 2013. «Gefitinib inhibits the cross-talk between mesenchymal stem cells and prostate cancer cells leading to tumor cell

- proliferation and inhibition of docetaxel activity». *J Cell Biochem*, vol. 114, no 5, p. 1135-1144.
- Bowie, A., et L. A. O'Neill. 2000. «The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products». *J Leukoc Biol*, vol. 67, no 4, p. 508-514.
- Brinckerhoff, C. E., et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, no 3, p. 207-214.
- Bunda, S., M. W. Kang, S. S. Sybingco, J. Weng, H. Favre, D. H. Shin, M. S. Irwin, M. L. Loh et M. Ohh. 2013. «Inhibition of SRC Corrects GM-CSF Hypersensitivity That Underlies Juvenile Myelomonocytic Leukemia». *Cancer Res*, vol. 73, no 8, p. 2540-2550.
- Bunnell, B. A., A. M. Betancourt et D. E. Sullivan. 2010. «New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells». *Stem Cell Res Ther*, vol. 1, no 5, p. 34.
- Bussolino, F., J. M. Wang, P. Defilippi, F. Turrini, F. Sanavio, C. J. Edgell, M. Aglietta, P. Arese et A. Mantovani. 1989a. «Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate». *Nature*, vol. 337, no 6206, p. 471-473.
- Bussolino, F., J. M. Wang, F. Turrini, D. Alessi, D. Ghigo, C. Costamagna, G. Pescarmona, A. Mantovani et A. Bosia. 1989b. «Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration». *J Biol Chem*, vol. 264, no 31, p. 18284-18287.
- Bussolino, F., M. Ziche, J. M. Wang, D. Alessi, L. Morbidelli, O. Cremona, A. Bosia, P. C. Marchisio et A. Mantovani. 1991. «In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors». *J Clin Invest*, vol. 87, no 3, p. 986-995.
- Byun, E. B., H. G. Choi, N. Y. Sung et E. H. Byun. 2012. «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor on lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 426, no 4, p. 480-485.

- Byun, E. H., T. Omura, K. Yamada et H. Tachibana. 2011. «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR2 signaling induced by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor». *FEBS Lett*, vol. 585, no 5, p. 814-820.
- Caplan, A. I., et J. E. Dennis. 2006. «Mesenchymal stem cells as trophic mediators». *J Cell Biochem*, vol. 98, no 5, p. 1076-1084.
- Carmeliet, P., et R. K. Jain. 2000. «Angiogenesis in cancer and other diseases». *Nature*, vol. 407, no 6801, p. 249-257.
- Cavet, M. E., K. L. Harrington, T. R. Vollmer, K. W. Ward et J. Z. Zhang. 2011. «Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells». *Mol Vis*, vol. 17, p. 533-542.
- Cecchini, M. G., M. G. Dominguez, S. Mocci, A. Wetterwald, R. Felix, H. Fleisch, O. Chisholm, W. Hofstetter, J. W. Pollard et E. R. Stanley. 1994. «Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse». *Development*, vol. 120, no 6, p. 1357-1372.
- Chantrain Y. et DeClerck C. 2002. «Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale». *médecine/science*, vol. 5, no 18, p. 565-575.
- Chaussain-Miller, C., F. Fioretti, M. Goldberg et S. Menashi. 2006. «The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries». *J Dent Res*, vol. 85, no 1, p. 22-32.
- Chen, S., Z. Liu, N. Tian, J. Zhang, F. Yei, B. Duan, Z. Zhu, S. Lin et T. W. Kwan. 2006. «Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery». *J Invasive Cardiol*, vol. 18, no 11, p. 552-556.
- Chitu, V., et E. R. Stanley. 2006. «Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation». *Curr Opin Immunol*, vol. 18, no 1, p. 39-48.
- Copland, I., K. Sharma, L. Lejeune, N. Eliopoulos, D. Stewart, P. Liu, K. Lachapelle et J. Galipeau. 2008. «CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization». *Exp Hematol*, vol. 36, no 1, p. 93-103.

- Cross, M. J., et L. Claesson-Welsh. 2001. «FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition». *Trends Pharmacol Sci*, vol. 22, no 4, p. 201-207.
- Cuiffo, B. G., et A. E. Karnoub. 2012. «Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts». *Cell Adh Migr*, vol. 6, no 3, p. 220-230.
- Curran, C. S., M. D. Evans et P. J. Bertics. 2011. «GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation, and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation». *J Immunol*, vol. 187, no 3, p. 1254-1263.
- Currie, J. C., S. Fortier, A. Sina, J. Galipeau, J. Cao et B. Annabi. 2007. «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem*, vol. 282, no 11, p. 8142-8149.
- Dai, L. J., M. R. Moniri, Z. R. Zeng, J. X. Zhou, J. Rayat et G. L. Warnock. 2011. «Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy». *Cancer Lett*, vol. 305, no 1, p. 8-20.
- Dazzi, F., L. Lopes et L. Weng. 2012. «Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'?». *Immunology*, vol. 137, no 3, p. 206-213.
- De Amicis, F., A. Perri, D. Vizza, A. Russo, M. L. Panno, D. Bonofiglio, C. Giordano, L. Mauro, S. Aquila, D. Tramontano et S. Ando. 2013. «Epigallocatechin gallate inhibits growth and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in human thyroid carcinoma cell lines». *J Cell Physiol*.
- De Luca, A., L. Lamura, M. Gallo, V. Maffia et N. Normanno. 2012. «Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration». *J Cell Biochem*, vol. 113, no 11, p. 3363-3370.
- Deakin, N. E., et M. A. Chaplain. 2013. «Mathematical modeling of cancer invasion: the role of membrane-bound matrix metalloproteinases». *Front Oncol*, vol. 3, p. 70.
- DelaRosa, O., et E. Lombardo. 2010. «Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential». *Mediators Inflamm*, vol. 2010, p. 865601.

- Demeule, M., A. Regina, B. Annabi, Y. Bertrand, M. W. Bojanowski et R. Beliveau. 2004. «Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors». *Mol Neurobiol*, vol. 30, no 2, p. 157-183.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti et A. M. Gianni. 2002. «Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli». *Blood*, vol. 99, no 10, p. 3838-3843.
- Dinarello, C. A. 2006. «The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 25, no 3, p. 307-313.
- . 2007. «Historical insights into cytokines». *Eur J Immunol*, vol. 37 Suppl 1, p. S34-45.
- Disis, M. L., H. Bernhard, F. M. Shiota, S. L. Hand, J. R. Gralow, E. S. Huseby, S. Gillis et M. A. Cheever. 1996. «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines». *Blood*, vol. 88, no 1, p. 202-210.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. J. Prockop et E. Horwitz. 2006. «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement». *Cytotherapy*, vol. 8, no 4, p. 315-317.
- Dranoff, G. 2004. «Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy». *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no 1, p. 11-22.
- Dranoff, G., A. D. Crawford, M. Sadelain, B. Ream, A. Rashid, R. T. Bronson, G. R. Dickersin, C. J. Bachurski, E. L. Mark, J. A. Whitsett et al. 1994. «Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis». *Science*, vol. 264, no 5159, p. 713-716.
- Duffy, M. M., J. Pindjakova, S. A. Hanley, C. McCarthy, G. A. Weidhofer, E. M. Sweeney, K. English, G. Shaw, J. M. Murphy, F. P. Barry, B. P. Mahon, O. Belton, R. Ceredig et M. D. Griffin. 2011. «Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor». *Eur J Immunol*, vol. 41, no 10, p. 2840-2851.

- Egeblad, M., E. S. Nakasone et Z. Werb. 2010. «Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism». *Dev Cell*, vol. 18, no 6, p. 884-901.
- Eisenach, P. A., P. C. de Sampaio, G. Murphy et C. Roghi. 2012. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) ubiquitination at Lys581 increases cellular invasion through type I collagen». *J Biol Chem*, vol. 287, no 14, p. 11533-11545.
- Eisenach, P. A., C. Roghi, M. Fogarasi, G. Murphy et W. R. English. 2010. «MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 23, p. 4182-4193.
- El-Haibi, C. P., G. W. Bell, J. Zhang, A. Y. Collmann, D. Wood, C. M. Scherber, E. Csizmadia, O. Mariani, C. Zhu, A. Campagne, M. Toner, S. N. Bhatia, D. Irimia, A. Vincent-Salomon et A. E. Karnoub. 2012. «Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no 43, p. 17460-17465.
- Fenton, M. J., et D. T. Golenbock. 1998. «LPS-binding proteins and receptors». *J Leukoc Biol*, vol. 64, no 1, p. 25-32.
- Ferrara, N. 2002. «VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors». *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no 10, p. 795-803.
- Ferriz-Martinez, R.A., Torres-Artega, I.C., Blanco-Labra, A., and Garcia-Gasca, T. 2010. «The Role of Plant Lectins in Cancer Treatment». *Nova Science*, p. 71-89.
- Folgueras, A. R., A. M. Pendas, L. M. Sanchez et C. Lopez-Otin. 2004. «Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies». *Int J Dev Biol*, vol. 48, no 5-6, p. 411-424.
- Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med*, vol. 1, no 1, p. 27-31.
- , 2002. «Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis». *Semin Oncol*, vol. 29, no 6 Suppl 16, p. 15-18.
- , 2003. «Fundamental concepts of the angiogenic process». *Curr Mol Med*, vol. 3, no 7, p. 643-651.

- Forget, M. A., R. R. Desrosiers et R. Beliveau. 1999. «Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 77, no 7, p. 465-480.
- Fortier, S., M. Touaibia, S. Lord-Dufour, J. Galipeau, R. Roy et B. Annabi. 2008. «Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells». *Glycobiology*, vol. 18, no 2, p. 195-204.
- Friedenstein, A. J., Shapiro Piatetzky, II et K. V. Petrakova. 1966. «Osteogenesis in transplants of bone marrow cells». *J Embryol Exp Morphol*, vol. 16, no 3, p. 381-390.
- Geng, L., A. Chaudhuri, G. Talmon, J. L. Wisecarver et J. Wang. 2013. «TGF-Beta suppresses VEGFA-mediated angiogenesis in colon cancer metastasis». *PLoS One*, vol. 8, no 3, p. e59918.
- Gingras, D., et R. Beliveau. 2010. «Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 1, p. 142-150.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo et R. Beliveau. 2008. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 3, p. 399-404.
- Giordanetto, F., et R. T. Kroemer. 2002. «Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7». *Protein Eng*, vol. 15, no 9, p. 727-737.
- Glenn, G., et P. van der Geer. 2008. «Toll-like receptors stimulate regulated intramembrane proteolysis of the CSF-1 receptor through Erk activation». *FEBS Lett*, vol. 582, no 6, p. 911-915.
- Goldsby R.A, Kindt T.J, Osborne B.A. 2003. *Les cytokines. In: Immunologie : Le cours de Janis Kuby*, Editions Dunod: 2003. Paris. ISBN: 2-10-007396-6.
- Gonzalo, P., et A. G. Arroyo. 2010. «MT1-MMP: A novel component of the macrophage cell fusion machinery». *Commun Integr Biol*, vol. 3, no 3, p. 256-259.

- Gonzalo, P., V. Moreno, B. G. Galvez et A. G. Arroyo. 2010. «MT1-MMP and integrins: Hand-to-hand in cell communication». *Biofactors*, vol. 36, no 4, p. 248-254.
- Goutagny, N., Y. Estornes, U. Hasan, S. Lebecque et C. Caux. 2012. «Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy». *Target Oncol*, vol. 7, no 1, p. 29-54.
- Grote, K., H. Schutt et B. Schieffer. 2011. «Toll-like receptors in angiogenesis». *ScientificWorldJournal*, vol. 11, p. 981-991.
- Gruber, R., B. Kandler, P. Holzmann, M. Vogele-Kadletz, U. Losert, M. B. Fischer et G. Watzek. 2005. «Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells». *Tissue Eng*, vol. 11, no 5-6, p. 896-903.
- Gu, F. M., Q. L. Li, Q. Gao, J. H. Jiang, K. Zhu, X. Y. Huang, J. F. Pan, J. Yan, J. H. Hu, Z. Wang, Z. Dai, J. Fan et J. Zhou. 2011. «IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma». *Mol Cancer*, vol. 10, p. 150.
- Guo, L., F. Yin, H. Q. Meng, L. Ling, T. N. Hu-He, P. Li, C. X. Zhang, S. Yu, D. S. Duan et H. X. Fan. 2005. «Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro». *Biomed Environ Sci*, vol. 18, no 1, p. 36-42.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell*, vol. 86, no 3, p. 353-364.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no 1, p. 57-70.
- , 2011. «Hallmarks of cancer: the next generation». *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674.
- Hautamaki, R. D., D. K. Kobayashi, R. M. Senior et S. D. Shapiro. 1997. «Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice». *Science*, vol. 277, no 5334, p. 2002-2004.

- He, Z. J., Z. J. Zou et X. T. Chen. 2009. «[Exploration of the effect of inhibitor of matrix metalloproteinase-9 on blood brain barrier in cardiopulmonary resuscitation in rats]». *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, vol. 21, no 6, p. 337-339.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck et A. Duschl. 2006. «Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 17, no 3, p. 173-188.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda et S. Akira. 2002. «Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway». *Nat Immunol*, vol. 3, no 2, p. 196-200.
- Houthuijzen, J. M., L. G. Daenen, J. M. Roodhart et E. E. Voest. 2012. «The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression». *Br J Cancer*, vol. 106, no 12, p. 1901-1906.
- Hu, X., J. Chen, L. Wang et L. B. Ivashkiv. 2007. «Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation». *J Leukoc Biol*, vol. 82, no 2, p. 237-243.
- Huang, W. H., M. C. Chang, K. S. Tsai, M. C. Hung, H. L. Chen et S. C. Hung. 2012. «Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice». *Oncogene*.
- Hunter, K. W., K. W. Broman, T. L. Voyer, L. Lukes, D. Cozma, M. T. Debies, J. Rouse et D. R. Welch. 2001. «Predisposition to efficient mammary tumor metastatic progression is linked to the breast cancer metastasis suppressor gene Brms1». *Cancer Res*, vol. 61, no 24, p. 8866-8872.
- Hunter, K. W., N. P. Crawford et J. Alsarraj. 2008. «Mechanisms of metastasis». *Breast Cancer Res*, vol. 10 Suppl 1, p. S2.
- Ingber, D. E., et J. Folkman. 1989. «How does extracellular matrix control capillary morphogenesis?». *Cell*, vol. 58, no 5, p. 803-805.
- Ingvarsen, S., A. Porse, C. Erpicum, L. Maertens, H. J. Jurgensen, D. H. Madsen, M. C. Melander, H. Gardsvoll, G. Hoyer-Hansen, A. Noel, K. Holmbeck, L. H. Engelholm et N. Behrendt. 2013. «Targeting a single function of the multifunctional matrix

- metalloprotease MT1-MMP: impact on lymphangiogenesis». *J Biol Chem*, vol. 288, no 15, p. 10195-10204.
- Ishizawa, R., et S. J. Parsons. 2004. «c-Src and cooperating partners in human cancer». *Cancer Cell*, vol. 6, no 3, p. 209-214.
- Itoh, Y. 2006. «MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue». *IUBMB Life*, vol. 58, no 10, p. 589-596.
- Javerzat, S., P. Auguste et A. Bikfalvi. 2002. «The role of fibroblast growth factors in vascular development». *Trends Mol Med*, vol. 8, no 10, p. 483-489.
- Ji, Y., Z. Wang, Z. Li, K. Li, X. Le et T. Zhang. 2012. «Angiotensin II induces angiogenic factors production partly via AT1/JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway in MHCC97H cells». *Cell Physiol Biochem*, vol. 29, no 5-6, p. 863-874.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada et C. M. Verfaillie. 2002. «Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow». *Nature*, vol. 418, no 6893, p. 41-49.
- Johansson, N., M. Ahonen et V. M. Kahari. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion». *Cell Mol Life Sci*, vol. 57, no 1, p. 5-15.
- Johnson, F. M., B. Saigal, M. Talpaz et N. J. Donato. 2005. «Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells». *Clin Cancer Res*, vol. 11, no 19 Pt 1, p. 6924-6932.
- Jost, M., A. R. Folgueras, F. Frerart, A. M. Pendas, S. Blacher, X. Houard, S. Berndt, C. Munaut, D. Cataldo, J. Alvarez, L. Melen-Lamalle, J. M. Foidart, C. Lopez-Otin et A. Noel. 2006. «Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice». *Cancer Res*, vol. 66, no 10, p. 5234-5241.
- Kahn, F. Papillon A. 2005. *Le secret de la salamandre – La médecine en quête d'immortalité*, Nil: 2005. p.217-218.

- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh et M. Seiki. 2001. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration». *J Cell Biol*, vol. 153, no 5, p. 893-904.
- Kamioka, Masashi, Toshiyuki Ishibashi, Hiroshi Ohkawara, Ryoji Nagai, Koichi Sugimoto, Hironori Uekita, Takanori Matsui, Sho-Ichi Yamagishi, Katsuya Ando, Takayuki Sakamoto, Nobuo Sakamoto, Yoh Takuwa, Ikuo Wada, Masashi Shiomi, Yukio Maruyama et Yasuchika Takeishi. 2011. «Involvement of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RAGE activation signaling pathways». *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, no 6, p. 1554-1563.
- Kanellopoulos, J. M., S. De Petris, G. Leca et M. J. Crumpton. 1985. «The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes». *Eur J Immunol*, vol. 15, no 5, p. 479-486.
- Kanno, H., H. Nishihara, L. Wang, S. Yuzawa, H. Kobayashi, M. Tsuda, T. Kimura, M. Tanino, S. Terasaka et S. Tanaka. 2013. «Expression of CD163 prevents apoptosis through the production of granulocyte colony-stimulating factor in meningioma». *Neuro Oncol*.
- Karow, M., T. Popp, V. Egea, C. Ries, M. Jochum et P. Neth. 2009. «Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression». *J Cell Mol Med*, vol. 13, no 8B, p. 2506-2520.
- Kasper, G., N. Dankert, J. Tuischer, M. Hoefft, T. Gaber, J. D. Glaeser, D. Zander, M. Tschirschmann, M. Thompson, G. Matziolis et G. N. Duda. 2007. «Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment». *Stem Cells*, vol. 25, no 4, p. 903-910.
- Kawai, T., et S. Akira. 2005. «Toll-like receptor downstream signaling». *Arthritis Res Ther*, vol. 7, no 1, p. 12-19.
- , 2007. «TLR signaling». *Semin Immunol*, vol. 19, no 1, p. 24-32.
- Kerst, J. M., M. de Haas, C. E. van der Schoot, I. C. Slaper-Cortenbach, M. Kleijer, A. E. van dem Borne et R. H. van Oers. 1993. «Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells». *Blood*, vol. 82, no 11, p. 3265-3272.

- Kessenbrock, K., V. Plaks et Z. Werb. 2010. «Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment». *Cell*, vol. 141, no 1, p. 52-67.
- Kevorkian, L., D. A. Young, C. Darrah, S. T. Donell, L. Shepstone, S. Porter, S. M. Brockbank, D. R. Edwards, A. E. Parker et I. M. Clark. 2004. «Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage». *Arthritis Rheum*, vol. 50, no 1, p. 131-141.
- Kim, M. J., H. J. Nam, H. P. Kim, S. W. Han, S. A. Im, T. Y. Kim, D. Y. Oh et Y. J. Bang. 2013. «OPB-31121, a novel small molecular inhibitor, disrupts the JAK2/STAT3 pathway and exhibits an antitumor activity in gastric cancer cells». *Cancer Lett*.
- Klopp, A. H., A. Gupta, E. Spaeth, M. Andreeff et F. Marini, 3rd. 2011. «Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?». *Stem Cells*, vol. 29, no 1, p. 11-19.
- Kloth, M. T., K. K. Laughlin, J. S. Biscardi, J. L. Boerner, S. J. Parsons et C. M. Silva. 2003. «STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor». *J Biol Chem*, vol. 278, no 3, p. 1671-1679.
- Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, V. Zernetkina, M. K. Majumdar, K. J. Beggs, D. W. Simonetti, R. J. Deans et K. R. McIntosh. 2005. «T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression». *J Biomed Sci*, vol. 12, no 1, p. 47-57.
- Kong, Y., et Y. Le. 2011. «Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system». *Int Immunopharmacol*, vol. 11, no 10, p. 1407-1414.
- Koziol, A., M. Martin-Alonso, C. Clemente, P. Gonzalo et A. G. Arroyo. 2012. «Site-specific cellular functions of MT1-MMP». *Eur J Cell Biol*, vol. 91, no 11-12, p. 889-895.
- Krampera, M., S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson et F. Dazzi. 2003. «Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide». *Blood*, vol. 101, no 9, p. 3722-3729.
- Krubasik, D., P. A. Eisenach, L. A. Kunz-Schughart, G. Murphy et W. R. English. 2008. «Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces endothelial capillary

formation through induction of membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in vitro». *Int J Cancer*, vol. 122, no 6, p. 1261-1272.

Launay, S. G., C. Ginestier, D. Birnbaum et E. Charafe-Jauffret. 2012. «Cellules souches du cancer du sein : prendre le cancer à la racine». *Oncologie*, vol. 14, no 9, p. 543-549.

Laurent-Puig, P., A. Lievre et H. Blons. 2009. «Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors». *Clin Cancer Res*, vol. 15, no 4, p. 1133-1139.

Le Blanc, K., et O. Ringden. 2005. «Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation». *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 11, no 5, p. 321-334.

Lee, G. Y., et C. T. Lim. 2007. «Biomechanics approaches to studying human diseases». *Trends Biotechnol*, vol. 25, no 3, p. 111-118.

Lee, Sylvia, et Kim Margolin. 2011. «Cytokines in Cancer Immunotherapy». *Cancers*, vol. 3, no 4, p. 3856-3893.

Lelievre, S., V. M. Weaver et M. J. Bissell. 1996. «Extracellular matrix signaling from the cellular membrane skeleton to the nuclear skeleton: a model of gene regulation». *Recent Prog Horm Res*, vol. 51, p. 417-432.

Leonard, W. J., et J. J. O'Shea. 1998. «Jaks and STATs: biological implications». *Annu Rev Immunol*, vol. 16, p. 293-322.

Li, H., X. Fan et J. Houghton. 2007. «Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer». *J Cell Biochem*, vol. 101, no 4, p. 805-815.

Liang, L., et J. R. Bickenbach. 2002. «Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development». *Stem Cells*, vol. 20, no 1, p. 21-31.

Lieu, C., J. Heymach, M. Overman, H. Tran et S. Kopetz. 2011. «Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis». *Clin Cancer Res*, vol. 17, no 19, p. 6130-6139.

- Limb, G. A., J. T. Daniels, A. D. Cambrey, G. A. Secker, A. J. Shortt, J. M. Lawrence et P. T. Khaw. 2006. «Current prospects for adult stem cell-based therapies in ocular repair and regeneration». *Curr Eye Res*, vol. 31, no 5, p. 381-390.
- Lin, C. M., Y. H. Chen, J. R. Ong, H. P. Ma, K. G. Shyu et K. J. Bai. 2012a. «Functional role of wogonin in anti-angiogenesis». *Am J Chin Med*, vol. 40, no 2, p. 415-427.
- Lin, R. Z., R. Moreno-Luna, B. Zhou, W. T. Pu et J. M. Melero-Martin. 2012b. «Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells». *Angiogenesis*, vol. 15, no 3, p. 443-455.
- Liu, G., C. L. Atteridge, X. Wang, A. D. Lundgren et J. D. Wu. 2010. «The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases». *J Immunol*, vol. 184, no 7, p. 3346-3350.
- Liu, K. D., S. L. Gaffen, M. A. Goldsmith et W. C. Greene. 1997. «Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation». *Curr Biol*, vol. 7, no 11, p. 817-826.
- Looyenga, B. D., D. Hutchings, I. Cherni, C. Kingsley, G. J. Weiss et J. P. Mackeigan. 2012. «STAT3 is activated by JAK2 independent of key oncogenic driver mutations in non-small cell lung carcinoma». *PLoS One*, vol. 7, no 2, p. e30820.
- Lord-Dufour, S., I. B. Copland, L. C. Levros, Jr., M. Post, A. Das, C. Khosla, J. Galipeau, E. Rassart et B. Annabi. 2009. «Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells». *Stem Cells*, vol. 27, no 3, p. 489-497.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, S. E. Haynesworth, S. P. Bruder et S. L. Gerson. 2000. «Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages». *J Hematother Stem Cell Res*, vol. 9, no 6, p. 841-848.
- Mantovani, A., et A. Sica. 2010. «Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity». *Curr Opin Immunol*, vol. 22, no 2, p. 231-237.

- Marchenko, G. N., N. D. Marchenko et A. Y. Strongin. 2003. «The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein». *Biochem J*, vol. 372, no Pt 2, p. 503-515.
- Markowicz, M., E. Koellensperger, S. Neuss, S. Koenigschulte, C. Bindler et N. Pallua. 2006. «Human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on modified collagen improved dermal regeneration in vivo». *Cell Transplant*, vol. 15, no 8-9, p. 723-732.
- Martinaud, Christophe, Cédric Thepenier, Marina Trouillas, Juliette Peltzer, Georges Uzan, Marie-Caroline Le Bousse Kerdilès, Marie Prat et Jean-Jacques Lataillade. 2010. «Les cellules souches mésenchymateuses : des cellules pour la médecine régénérative du futur ?». *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2010, no 427, p. 47-59.
- Matias-Roman, S., B. G. Galvez, L. Genis, M. Yanez-Mo, G. de la Rosa, P. Sanchez-Mateos, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium». *Blood*, vol. 105, no 10, p. 3956-3964.
- Matsumoto, T., I. Turesson, M. Book, P. Gerwins et L. Claesson-Welsh. 2002. «p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis». *J Cell Biol*, vol. 156, no 1, p. 149-160.
- McQuibban, G. A., G. S. Butler, J. H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis et C. M. Overall. 2001. «Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1». *J Biol Chem*, vol. 276, no 47, p. 43503-43508.
- Meirelles Lda, S., A. M. Fontes, D. T. Covas et A. I. Caplan. 2009. «Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 20, no 5-6, p. 419-427.
- Meriane, M., S. Duhamel, L. Lejeune, J. Galipeau et B. Annabi. 2006. «Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells». *Stem Cells*, vol. 24, no 11, p. 2557-2565.
- Mirotsov, M., T. M. Jayawardena, J. Schmeckpeper, M. Gneccchi et V. J. Dzau. 2011. «Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 50, no 2, p. 280-289.

- Mizrak, D., M. Brittan et M. Alison. 2008. «CD133: molecule of the moment». *J Pathol*, vol. 214, no 1, p. 3-9.
- Moss, N. M., Y. I. Wu, Y. Liu, H. G. Munshi et M. S. Stack. 2009. «Modulation of the membrane type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail enhances tumor cell invasion and proliferation in three-dimensional collagen matrices». *J Biol Chem*, vol. 284, no 30, p. 19791-19799.
- Mueller, M. M., C. C. Herold-Mende, D. Riede, M. Lange, H. H. Steiner et N. E. Fusenig. 1999. «Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression». *Am J Pathol*, vol. 155, no 5, p. 1557-1567.
- Nagase, H., et J. F. Woessner, Jr. 1999. «Matrix metalloproteinases». *J Biol Chem*, vol. 274, no 31, p. 21491-21494.
- Nagy, J. D., et D. Armbruster. 2012. «Evolution of uncontrolled proliferation and the angiogenic switch in cancer». *Math Biosci Eng*, vol. 9, no 4, p. 843-876.
- Nakada, Mitsutoshi, Daisuke Kita, Takuya Watanabe, Yutaka Hayashi, Lei Teng, Ilya V. Pyko et Jun-Ichiro Hamada. 2011. «Aberrant Signaling Pathways in Glioma». *Cancers*, vol. 3, no 3, p. 3242-3278.
- Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff et F. F. Lang. 2005. «Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas». *Cancer Res*, vol. 65, no 8, p. 3307-3318.
- Nishimura, H., M. Nishimura, R. Oda, K. Yamanaka, T. Matsubara, Y. Ozaki, K. Sekiya, T. Hamada et Y. Kato. 2004. «Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds». *Exp Cell Res*, vol. 295, no 1, p. 119-127.
- Nyalendo, C., E. Beaulieu, H. Sartelet, M. Michaud, N. Fontaine, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice». *Carcinogenesis*, vol. 29, no 8, p. 1655-1664.

- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem*, vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- Ohki, Y., B. Heissig, Y. Sato, H. Akiyama, Z. Zhu, D. J. Hicklin, K. Shimada, H. Ogawa, H. Daida, K. Hattori et A. Ohsaka. 2005. «Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils». *FASEB J*, vol. 19, no 14, p. 2005-2007.
- Oppenheim, J., et H. Fujiwara. 1996. «The role of cytokines in cancer». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 7, no 3, p. 279-288.
- Ornitz, D. M., et N. Itoh. 2001. «Fibroblast growth factors». *Genome Biol*, vol. 2, no 3, p. REVIEWS3005.
- Osenkowski, P., S. O. Meroueh, D. Pavel, S. Mobashery et R. Fridman. 2005. «Mutational and structural analyses of the hinge region of membrane type 1-matrix metalloproteinase and enzyme processing». *J Biol Chem*, vol. 280, no 28, p. 26160-26168.
- Pajkrt, D., A. Manten, T. van der Poll, M. M. Tiel-van Buul, J. Jansen, J. Wouter ten Cate et S. J. van Deventer. 1997. «Modulation of cytokine release and neutrophil function by granulocyte colony-stimulating factor during endotoxemia in humans». *Blood*, vol. 90, no 4, p. 1415-1424.
- Papetti, M., et I. M. Herman. 2002. «Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 282, no 5, p. C947-970.
- Parsons, S. J., et J. T. Parsons. 2004. «Src family kinases, key regulators of signal transduction». *Oncogene*, vol. 23, no 48, p. 7906-7909.
- Pepper, M. S., D. Baetens, S. J. Mandriota, C. Di Sanza, S. Oikemus, T. F. Lane, J. V. Soriano, R. Montesano et M. L. Iruela-Arispe. 2000. «Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution». *Dev Dyn*, vol. 218, no 3, p. 507-524.
- Pesu, M., A. Laurence, N. Kishore, S. H. Zwillich, G. Chan et J. J. O'Shea. 2008. «Therapeutic targeting of Janus kinases». *Immunol Rev*, vol. 223, p. 132-142. NLM.

- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, M. Cohen-Sfady, L. Rousso-Noori, A. Zanin-Zhorov, S. Cohen, I. R. Cohen et D. Zipori. 2007. «Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions». *Blood*, vol. 109, no 4, p. 1422-1432.
- Pittenger, M., P. Vanguri, D. Simonetti et R. Young. 2002. «Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy». *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 2, no 4, p. 309-320.
- Pixley, F. J., et E. R. Stanley. 2004. «CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action». *Trends Cell Biol*, vol. 14, no 11, p. 628-638.
- Pratt, J., R. Roy et B. Annabi. 2012. «Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells». *Glycobiology*, vol. 22, no 9, p. 1245-1255.
- Prescott L., Harley J. et A. Klein. *Microbiology*. Edition de Boeck. 2003. Bruxelles. ISBN: 2-8041-4256-6
- Proulx-Bonneau, S., A. Guezguez et B. Annabi. 2011. «A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells». *PLoS One*, vol. 6, no 6, p. e21511.
- Quintas-Cardama, A., H. Kantarjian, J. Cortes et S. Verstovsek. 2011. «Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 10, no 2, p. 127-140.
- Rafii, S., S. Meeus, S. Dias, K. Hattori, B. Heissig, S. Shmelkov, D. Rafii et D. Lyden. 2002. «Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 13, no 1, p. 61-67.
- Remacle, A. G., V. S. Golubkov, S. A. Shiryayev, R. Dahl, J. L. Stebbins, A. V. Chernov, A. V. Cheltsov, M. Pellicchia et A. Y. Strongin. 2012. «Novel MT1-MMP small-molecule inhibitors based on insights into hemopexin domain function in tumor growth». *Cancer Res*, vol. 72, no 9, p. 2339-2349.
- Ren, Z., et T. S. Schaefer. 2002. «ErbB-2 activates Stat3 α in a Src- and JAK2-dependent manner». *J Biol Chem*, vol. 277, no 41, p. 38486-38493.

- Revoltella, R. P., M. Menicagli et D. Campani. 2012. «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas». *Cytokine*, vol. 57, no 3, p. 347-359.
- Ribatti, D. 2012. «Angiogenic activity of classical hematopoietic cytokines». *Leuk Res*, vol. 36, no 5, p. 537-543.
- Ringden, O., et K. Le Blanc. 2005. «Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives». *APMIS*, vol. 113, no 11-12, p. 813-830.
- Rio, M. C. 2005. «From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation». *Biochimie*, vol. 87, no 3-4, p. 299-306.
- Risau, W., et I. Flamme. 1995. «Vasculogenesis». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 11, p. 73-91.
- Rochman, Y., R. Spolski et W. J. Leonard. 2009. «New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines». *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no 7, p. 480-490.
- Rodriguez, D., C. J. Morrison et C. M. Overall. 2010. «Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 1, p. 39-54.
- Romieu-Mourez, R., M. Francois, M. N. Boivin, M. Bouchentouf, D. E. Spaner et J. Galipeau. 2009. «Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype». *J Immunol*, vol. 182, no 12, p. 7963-7973.
- Rubbia-Brandt, L., A. P. Sappino et G. Gabbiani. 1991. «Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts». *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, vol. 60, no 2, p. 73-82.
- Ruef, C., et D. L. Coleman. 1990. «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness». *Rev Infect Dis*, vol. 12, no 1, p. 41-62.
- Rusthoven, J. 1991. «The potential role of recombinant hematopoietic colony-stimulating factors in preventing infections in the immunocompromised host». *Can J Infect Dis*, vol. 2, no 2, p. 74-88.

- Sakamoto, T., et M. Seiki. 2009. «Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity». *Genes Cells*, vol. 14, no 5, p. 617-626.
- Sampson, M., Q. S. Zhu et S. J. Corey. 2007. «Src kinases in G-CSF receptor signaling». *Front Biosci*, vol. 12, p. 1463-1474.
- Sassoli, Chiara, Sandra Zecchi-Orlandini et Lucia Formigli. 2012. «Trophic Actions of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Muscle Repair/Regeneration». *Cells*, vol. 1, no 4, p. 832-850.
- Savinov, A. Y., et A. Y. Strongin. 2013. «Targeting the T-cell membrane type-1 matrix metalloproteinase-CD44 axis in a transferred type 1 diabetes model in NOD mice». *Exp Ther Med*, vol. 5, no 2, p. 438-442.
- Scheibe, F., J. Ladhoff, J. Huck, M. Grohmann, K. Blazej, A. Oersal, N. Baeva, M. Seifert et J. Priller. 2012. «Immune effects of mesenchymal stromal cells in experimental stroke». *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 32, no 8, p. 1578-1588.
- Scoazec, J. Y. 2000. «[Tumor angiogenesis: histologic features]». *Bull Acad Natl Med*, vol. 184, no 3, p. 547-554; discussion 554-545.
- Sielska, M., P. Przanowski, B. Wylot, K. Gabrusiewicz, M. Maleszewska, M. Kijewska, M. Zawadzka, J. Kucharska, K. Vinnakota, H. Kettenmann, K. Kotulska, W. Grajkowska et B. Kaminska. 2013. «Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response». *J Pathol*.
- Sina, A., S. Lord-Dufour et B. Annabi. 2009. «Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation». *Cancer Lett*, vol. 279, no 2, p. 171-176.
- Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao et B. Annabi. 2010. «The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway». *J Cell Commun Signal*, vol. 4, no 1, p. 31-38.

- Singh, B. N., S. Shankar et R. K. Srivastava. 2011. «Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications». *Biochem Pharmacol*, vol. 82, no 12, p. 1807-1821.
- Singh, T., et S. K. Katiyar. 2011. «Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition». *PLoS One*, vol. 6, no 10, p. e25224.
- Son, B. R., L. A. Marquez-Curtis, M. Kucia, M. Wysoczynski, A. R. Turner, J. Ratajczak, M. Z. Ratajczak et A. Janowska-Wieczorek. 2006. «Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases». *Stem Cells*, vol. 24, no 5, p. 1254-1264.
- Sounni, N. E., L. Devy, A. Hajitou, F. Frankenke, C. Munaut, C. Gilles, C. Deroanne, E. W. Thompson, J. M. Foidart et A. Noel. 2002. «MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression». *FASEB J*, vol. 16, no 6, p. 555-564.
- Spaeth, E. L., J. L. Dembinski, A. K. Sasser, K. Watson, A. Klopp, B. Hall, M. Andreeff et F. Marini. 2009. «Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression». *PLoS One*, vol. 4, no 4, p. e4992.
- Stamenkovic, I. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis». *Semin Cancer Biol*, vol. 10, no 6, p. 415-433.
- Sternlicht, M. D., et Z. Werb. 2001. «How matrix metalloproteinases regulate cell behavior». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, p. 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G., et A. E. Yu. 2001. «Proteases in invasion: matrix metalloproteinases». *Semin Cancer Biol*, vol. 11, no 2, p. 143-152.
- Strongin, A. Y. 2010. «Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 1, p. 133-141.

- Studený, M., F. C. Marini, R. E. Champlin, C. Zompetta, I. J. Fidler et M. Andreeff. 2002. «Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors». *Cancer Res*, vol. 62, no 13, p. 3603-3608.
- Sun, X. T., X. W. Yuan, H. T. Zhu, Z. M. Deng, D. C. Yu, X. Zhou et Y. T. Ding. 2012. «Endothelial precursor cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma». *World J Gastroenterol*, vol. 18, no 35, p. 4925-4933.
- Takagi, Y., H. Nakamura, K. Miwa, Y. Adachi, S. Fujioka, T. Haruki et Y. Taniguchi. 2010. «A case of G-CSF-producing invasive apical cancer resected following preoperative adjuvant therapy». *Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 58, no 5, p. 304-306.
- Takeda, K., et S. Akira. 2005. «Toll-like receptors in innate immunity». *Int Immunol*, vol. 17, no 1, p. 1-14.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda et S. Akira. 2001. «Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6». *Int Immunol*, vol. 13, no 7, p. 933-940.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack et C. M. Overall. 2004. «Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 18, p. 6917-6922.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall et J. M. Jones. 1998. «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, vol. 282, no 5391, p. 1145-1147.
- Timpl, R., et J. C. Brown. 1996. «Supramolecular assembly of basement membranes». *Bioessays*, vol. 18, no 2, p. 123-132.
- Tkach, M., C. Rosembliet, M. A. Rivas, C. J. Proietti, M. C. Diaz Flaquer, M. F. Mercogliano, W. Beguelin, E. Maronna, P. Guzman, F. G. Gercovich, E. G. Deza, P. V. Elizalde et R. Schillaci. 2013. «p42/p44 MAPK-mediated Stat3Ser727 phosphorylation is required for progestin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth». *Endocr Relat Cancer*, vol. 20, no 2, p. 197-212.
- Tonini, T., F. Rossi et P. P. Claudio. 2003. «Molecular basis of angiogenesis and cancer». *Oncogene*, vol. 22, no 42, p. 6549-6556.

- Torsvik, A., et R. Bjerkvig. 2013. «Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression». *Cancer Treat Rev*, vol. 39, no 2, p. 180-188.
- Touboul, C., R. Lis, H. Al Farsi, C. M. Raynaud, M. Warfa, H. Althawadi, E. Mery, M. Mirshahi et A. Rafii. 2013. «Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6 secretion in an amniochorionic membrane based 3D model». *J Transl Med*, vol. 11, p. 28.
- Trosko, J. E., et R. J. Ruch. 1998. «Cell-cell communication in carcinogenesis». *Front Biosci*, vol. 3, p. d208-236.
- Tu, H. J., T. H. Lin, Y. C. Chiu, C. H. Tang, R. S. Yang et W. M. Fu. 2013. «Enhancement of placenta growth factor expression by oncostatin M in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts». *J Cell Physiol*, vol. 228, no 5, p. 983-990.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *J Cell Biol*, vol. 155, no 7, p. 1345-1356.
- Uekita, T., I. Gotoh, T. Kinoshita, Y. Itoh, H. Sato, T. Shiomi, Y. Okada et M. Seiki. 2004. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors». *J Biol Chem*, vol. 279, no 13, p. 12734-12743.
- Ulloa-Montoya, F., C. M. Verfaillie et W. S. Hu. 2005. «Culture systems for pluripotent stem cells». *J Biosci Bioeng*, vol. 100, no 1, p. 12-27.
- Umegaki, K., A. Sugisawa, K. Yamada et M. Higuchi. 2001. «Analytical method of measuring tea catechins in human plasma by solid-phase extraction and HPLC with electrochemical detection». *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, vol. 47, no 6, p. 402-408.
- Unitt, J., et D. Hornigold. 2011. «Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists». *Biochem Pharmacol*, vol. 81, no 11, p. 1324-1328.

- van Haaften, T., et B. Thebaud. 2006. «Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases». *Pediatr Res*, vol. 59, no 4 Pt 2, p. 94R-99R.
- Van Wart, H. E., et H. Birkedal-Hansen. 1990. «The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no 14, p. 5578-5582.
- Velasco, G., A. M. Pendas, A. Fueyo, V. Knauper, G. Murphy et C. Lopez-Otin. 1999. «Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members». *J Biol Chem*, vol. 274, no 8, p. 4570-4576.
- Vineis, P., A. Schatzkin et J. D. Potter. 2010. «Models of carcinogenesis: an overview». *Carcinogenesis*, vol. 31, no 10, p. 1703-1709.
- Visse, R., et H. Nagase. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry». *Circ Res*, vol. 92, no 8, p. 827-839.
- Wang, J., L. Yao, S. Zhao, X. Zhang, J. Yin, Y. Zhang, X. Chen, M. Gao, E. A. Ling, A. Hao et G. Li. 2012. «Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells». *Cancer Biol Ther*, vol. 13, no 6, p. 389-400.
- Weidner, N. 1993. «Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication». *Semin Diagn Pathol*, vol. 10, no 4, p. 302-313.
- Weinberg, R. A. 1989. «Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis». *Cancer Res*, vol. 49, no 14, p. 3713-3721.
- Weinberg, R. A. 2007. «The biology of cancer.» Garland Science, Taylor and Francis Group
- Weis, S. M., et D. A. Cheresh. 2011. «Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets». *Nat Med*, vol. 17, no 11, p. 1359-1370.
- Williams, K. C., et M. G. Coppelino. 2011. «Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7

- (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration». *J Biol Chem*, vol. 286, no 50, p. 43405-43416.
- Wong, R. S. 2011. «Mesenchymal stem cells: angels or demons?». *J Biomed Biotechnol*, vol. 2011, p. 459510.
- Wu, Y., L. Chen, P. G. Scott et E. E. Tredget. 2007. «Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis». *Stem Cells*, vol. 25, no 10, p. 2648-2659.
- Xie, T. X., F. J. Huang, K. D. Aldape, S. H. Kang, M. Liu, J. E. Gershenwald, K. Xie, R. Sawaya et S. Huang. 2006. «Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis». *Cancer Res*, vol. 66, no 6, p. 3188-3196.
- Xu, W., X. Zhang, H. Qian, W. Zhu, X. Sun, J. Hu, H. Zhou et Y. Chen. 2004. «Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro». *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 229, no 7, p. 623-631.
- Xu, X., Y. L. Sun et T. Hoey. 1996. «Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain». *Science*, vol. 273, no 5276, p. 794-797.
- Yamakawa, S., T. Asai, T. Uchida, M. Matsukawa, T. Akizawa et N. Oku. 2004. «(-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis». *Cancer Lett*, vol. 210, no 1, p. 47-55.
- Yamamura, M., R. L. Modlin, J. D. Ohmen et R. L. Moy. 1993. «Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer». *J Clin Invest*, vol. 91, no 3, p. 1005-1010.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand et J. Holash. 2000. «Vascular-specific growth factors and blood vessel formation». *Nature*, vol. 407, no 6801, p. 242-248.
- Yang, C. S., L. Chen, M. J. Lee, D. Balentine, M. C. Kuo et S. P. Schantz. 1998. «Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 7, no 4, p. 351-354.

- Yoshioka, T., M. Takahashi, Y. Shiba, C. Suzuki, H. Morimoto, A. Izawa, H. Ise et U. Ikeda. 2006. «Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice». *Cardiovasc Res*, vol. 70, no 1, p. 61-69.
- Yu, H., et R. Jove. 2004. «The STATs of cancer--new molecular targets come of age». *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no 2, p. 97-105.
- Yu, H., M. Kortylewski et D. Pardoll. 2007. «Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment». *Nat Rev Immunol*, vol. 7, no 1, p. 41-51.
- Zeng, J., K. Xie, H. Wu, B. Zhang et C. Huang. 2012. «Identification and functional study of cytokines and chemokines involved in tumorigenesis». *Comb Chem High Throughput Screen*, vol. 15, no 3, p. 276-285.
- Zhang, G., Y. Wang, Y. Zhang, X. Wan, J. Li, K. Liu, F. Wang, K. Liu, Q. Liu, C. Yang, P. Yu, Y. Huang, S. Wang, P. Jiang, Z. Qu, J. Luan, H. Duan, L. Zhang, A. Hou, S. Jin, T. C. Hsieh et E. Wu. 2012. «Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy». *Curr Mol Med*, vol. 12, no 2, p. 163-176.
- Zhao, W.X et X.H. Yang. 2010. PI3K-dependent ERK is involved in GM-CSF-mediated activation of progenitor cells in a neovascularisation model. *South African Journal of Science*, vol. 106, no 5-6, p. 214-223.
- Zinocker, S., et J. T. Vaage. 2012. «Rat mesenchymal stromal cells inhibit T cell proliferation but not cytokine production through inducible nitric oxide synthase». *Front Immunol*, vol. 3, p. 62.